



Untersuchungen zur Regulation der 7S RNA Transkription

Dissertation

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

HARTMUT KLEINERT

Bochum 1989

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.89

Referent : Prof. Dr. B.J. Benecke

Korreferent : Prof. Dr. G. Link

Die vorliegende Arbeit entstand am Lehrstuhl für Biochemie der Abteilung für Chemie der Ruhr-Universität Bochum unter Leitung von Herrn Prof. Dr. B.J. Benecke.

Ich danke Herrn Prof. Dr. B.J. Benecke für die Überlassung des interessanten Themas sowie für seine Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. O. Pongs danke ich für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biochemie danken, die mir durch ihre Ratschläge bei der Erstellung der Arbeit geholfen haben. Dies gilt insbesondere für Herrn S. Bredow, Herrn T. Walter, Herrn G. Feigl, Frau I. Krah-Jentgens, Herrn R. Müller, und Herrn D. Voß. Bei Herrn K. Grabert möchte ich mich für seine Unterstützung bei den photographischen Arbeiten bedanken.

<u>Inhaltsverzeichnis:</u>	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Materialien</u>	8
2.1. Herkunft der verwendeten Chemikalien	8
2.2. Herkunft der verwendeten Enzyme	9
3. <u>Experimentelle Methoden</u>	10
3.1. HeLa S3-Zellen	10
3.2. <u>In-vitro</u> Transkription isolierter Gensequenzen in zell- freien Extrakten	10
3.2.1. Präparation des S100-Zell-Extraktes	10
3.2.2. <u>In-vitro</u> Transkription mit Zell-Extrakten	11
3.2.2.1. <u>In-vitro</u> Transkription unter Einsatz von α - ³² P-UTP zur direkten Markierung der Transkripte	11
3.2.2.2. <u>In-vitro</u> Transkription zur S ₁ -Analyse	12
3.3. Transfektion von Zellkulturzellen und Isolierung von RNA aus den transfizierten Zellen	13
3.3.1. Transfektion von Zellkultur-Zellen	13
3.3.2. Isolierung von RNA aus Zellkultur-Zellen	14
3.3.3. Extrakt-Präparation aus transfizierten Zellen zur Bestim- mung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität	15
3.3.3.1. Präparation des "CAT"-Extraktes	16
3.3.3.2. Bestimmung der "CAT"-Aktivität	16
3.4. S ₁ -Kartierung von Transkripten	17
3.4.1. Hybridisierung	17
3.4.2. S ₁ -Verdauung	18
3.5. Subklonierungen von DNA-Molekülen	18
3.5.1. Restriktion von DNA-Molekülen	18
3.5.2. Phosphatase-Behandlung	19
3.5.3. Auffüllreaktion	20
3.5.4. Abdauen der Enden mit Mung Bohnen Nuklease	20
3.5.5. Verdauung von DNA-Molekülen mit der Exonuklease Bal 31	20
3.5.6. Ligation	21
3.5.7. Transformation von Bakterien	22
3.5.7.1. Transformation mit Plasmid-DNA	22
3.5.7.2. Transformation mit M13-Derivaten	22

3.5.8.	Herstellung kompetenter Bakterien	23
3.6.	DNA-Präparationen	23
3.6.1.	Plasmid-Präparationen	23
3.6.1.1.	Plasmid-Präparation im kleinen Maßstab	23
3.6.1.2.	Plasmid-Präparation im großen Maßstab	24
3.6.2.	Präparation von Einzelstrang-DNA im kleinen Maßstab	24
3.6.2.1.	Präparation von einzelsträngiger DNA bei M13mp18-Derivaten	25
3.6.2.2.	Präparation von Einzelstrang-DNA bei pBluescript-Derivaten	25
3.7.	Endmarkierung von DNA	26
3.7.1.	5'-Endmarkierung von DNA	26
3.7.2.	3'-Endmarkierung	27
3.8.	Gelelektrophorese	27
3.8.1.1.	Agarose-Gelelektrophorese	27
3.8.1.2.	Rückgewinnung von DNA-Molekülen aus Agarose-Gelen	27
3.8.2.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
3.8.2.1.	Native Polyacrylamidgele	28
3.8.2.2.	Denaturierende Harnstoffgele	28
3.9.	Autoradiographie/Bestimmung der radioaktiven Aktivität	29
3.9.1.	Autoradiographie	29
3.9.2.	Bestimmung der radioaktiven Aktivität ausgeschnittener Gelbanden	30
3.10.	DNA-Sequenzierungen	30
3.10.1.	DNA-Sequenzierung nach Maxam und Gilbert	30
3.10.2.	DNA-Sequenzierung nach Sanger	30
3.11.	Ortsspezifische Mutagenese mit synthetischen Oligonukleotiden	30
3.12.	"Dot-Blot"-Hybridisierungen	31
4.	<u>Ergebnisse</u>	33
4.1.	Einfluß verschiedener DNA-Sequenzen auf die <u>in-vitro</u> Transkription des menschlichen 7S K RNA Gens	33
4.1.1.	<u>In-vitro</u> Transkription mit 7S K-Deletionsmutanten	33
4.1.2.	<u>In-vitro</u> Transkription der 7S K-pAT153-Fusionskonstrukte	36
4.1.3.	Die Funktionalität der "TATA"-Box im 7S K RNA Gen-Pro-motor	39

4.1.4.	Bedeutung der Sequenz am Initiationspunkt für die Transkription des 7S K RNA Gens	41
4.2.	Austausch der 5'-flankierenden Sequenzen zwischen dem 7S K und dem 7S L RNA Gen	43
4.2.1.	<u>In-vitro</u> Transkription des Konstruktes pUC8 5'K-LG	45
4.2.2.	<u>In-vitro</u> Transkription des Subklons pAT 5'L-KG	46
4.3.	Bestimmung der geninternen Promotor-Sequenzen des 7S L Gens	49
4.4.	Analysen zur <u>in-vivo</u> Expression des 7S K RNA Gens	54
4.4.1.	Die <u>in-vivo</u> Expression des 7S K Gens ist von der 5'-flankierenden Sequenz im Bereich von -111 bis -242 abhängig.	54
4.4.2.	"Enhancer"-Analysen	57
4.4.2.1.	Konstruktion und <u>in-vivo</u> Expression der Subklone penh5'a, penh5'b, penh3'a und penh3'b	59
4.4.2.2.	Konstruktion und <u>in-vivo</u> Expression der Subklone pA107SKenh5'a und pA107SKenh5'b	62
4.4.3.	Eingrenzung des zur <u>in-vivo</u> Expression des 7S K Gens notwendigen 5'-flankierenden distalen Sequenz-Elementes	64
4.4.3.1.	<u>In-vivo</u> Expression der 5'-Deletionsklone	64
4.4.3.2.	<u>In-vivo</u> Expression der durch ortsspezifische Mutagenese erzeugten DNA-Konstrukte	66
4.4.3.3.	<u>In-vivo</u> Expression von Substitutionskonstrukten	70
5.	<u>Diskussion</u>	73
6.	<u>Zusammenfassung</u>	85
7.	<u>Literaturverzeichnis</u>	87

Abkürzungen:

(alle übrigen Abkürzungen sind im Text erklärt)

ATP	Adenosintriphosphat
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum-Albumin
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-phosphat
Ci	Curie
CIAP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ddNTP	Didesoxyribonukleotid
ddATP	2',3'-Didesoxyadenosin-5'-triphosphat
ddCTP	2',3'-Didesoxycytidin-5'-triphosphat
ddGTP	2',3'-Didesoxyguanosin-5'-triphosphat
ddTTP	2',3'-Didesoxythymidin-5'-triphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotid
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
DSE	distales stimulierendes Sequenz-Element
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Natriumsalz
EGTA	Ethylen-Glykol-bis-(β -Amino-Ethyl-Ether)-N,N'-Tetraessigsäure
EtOH	Ethanol pa.
fl.	flüssig
g	Erdbeschleunigung (9,81m/s ²)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-Ethansulfonsäure
hnRNA	"heterogenous nuclear" RNA
kb	Kilobasen
LM	Lichtmikroskop
LS	Lauroylsarkosin
min	Minute

mRNA	"messenger" RNA
nt	Nukleotide
NTP	Ribonukleotide (ATP/CTP/GTP/UTP)
OD	Optische Dichte
PEG	Polyethylenglykol
PIPES	Piperazin-N-N'-bis-(2-Ethansulfonsäure)
poly(A)	Polyadenylsäure
PSE	proximales Sequenz-Element
PVP	Polyvinylpyrrolidin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Sedimentationskoeffizient (Svedberg)
scRNA	"small cytoplasmic" RNA
scRNP	"small cytoplasmic ribonucleoprotein"
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SNPI-RNA	"small nuclear Polymerase I" RNA
snRNA	"small nuclear" RNA
snRNP	"small nuclear ribonucleoprotein"
SV40	Simian Virus 40
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	"transfer" RNA
U	Enzymeinheit
UTP	Uridintriphosphat
VRC	Vanadyl-Ribonukleosid-Komplex
wt	Wildtyp



1. Einleitung:

Die fein abgestimmten Regulationsmechanismen, die die Expression von Genen auch hinsichtlich der Stadien- und Gewebespezifität steuern, scheinen zu einem großen Teil auf der Ebene der Transkription zu wirken (1,2). Daher ist es Ziel vieler Untersuchungen, die Interaktion zwischen den daran beteiligten Komponenten auf molekularer Ebene zu analysieren.

Im Kern eukaryoter Zellen existieren 3 Klassen von DNA-abhängigen RNA Polymerasen, die sich in in-vitro Studien hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber dem Pilzgift α -Amanitin unterscheiden lassen (3 - 5).

Die RNA Polymerase I, die gegen sehr hohe Konzentrationen an α -Amanitin resistent ist ($> 200 \mu\text{g/ml}$), synthetisiert die Vorstufe der ribosomalen RNAs (bei Säugern 45 S prä-rRNA), aus der durch Prozessierungs-Vorgänge die ribosomalen RNAs gebildet werden (bei Säugern 28 S, 18 S, 5,8 S rRNA). Diese rRNAs sind Bestandteil der Ribosomen, an denen im Cytoplasma die Protein-Synthese stattfindet (6,7). Daneben ist die RNA Polymerase I noch für die Synthese der niedermolekularen SNPI-RNAs verantwortlich, über deren biologische Rolle sehr wenige Daten vorliegen (8 - 14).

Die RNA Polymerase II, die schon gegen Spuren von α -Amanitin sensitiv ist (50 % Hemmung bei $0,1 \mu\text{g/ml}$), ist für die Synthese der hnRNAs (heteronucleare Ribonucleinsäuren) verantwortlich, aus denen durch Prozessierung die mRNAs ("messenger"-RNAs; 15,16) gebildet werden. Die RNA Polymerase II bildet weiterhin einige kleine, im Zellkern lokalisierte sogenannte snRNAs ("small nuclear RNA", snRNA U₁ bis U₅), die in Proteinpartikel ("small nuclear ribonucleoproteins", snRNPs) verpackt, an der Reifung von RNAs beteiligt sind (16,17).

Die RNA Polymerase III, die eine intermediäre Sensitivität auf α -Amanitin zeigt (10 bis $22 \mu\text{g/ml}$ zur 50 % Hemmung nötig), synthetisiert im Gegensatz zu den anderen beiden RNA Polymerasen nur niedermolekulare RNAs. Zu dieser Gruppe gehören die 5S rRNA, die tRNAs ("transfer"-RNAs) und die beiden als scRNAs ("small cytoplasmic") bezeichneten 7S RNAs (7S L und 7S K). Zusätzlich sind die viralen VA-RNAs des Adenovirus-Genoms, sowie die ähnlichen EBER-RNAs des Epstein Barr-Virusgenoms, als Produkte der RNA Polymerase III beschrieben worden (18 - 23). Die RNA Polymerase III ist weiterhin für die Synthese der snRNA U₆ verantwortlich, die wie die anderen snRNAs an Prozessierungsreaktionen beteiligt und gemeinsam mit der snRNA U₄ in einem snRNP zu finden ist (21,22).

Die Feinstruktur der eukaryoten RNA Polymerasen ist noch nicht vollständig geklärt. Es handelt sich dabei um äußerst konservative Enzyme mit mehreren Untereinheiten. Die eukaryoten RNA Polymerasen selbst sind nur zu einer unspezifischen Initiation der Transkription in der Lage; sie können ihre spezifischen Promotoren nicht allein erkennen. Versuche mit Antikörpern zeigen, daß bei den drei RNA Polymerasen z.T. gleiche antigene Determinanten vorhanden sind. Es wird diskutiert, daß einige Untereinheiten bei den drei verschiedenen RNA Polymerasen gleich sind (21).

Gereinigte RNA Polymerase III ist allein in der Lage, an der Sequenz (vier T Reste in einer GC-reichen Sequenz) zu terminieren, die in-vitro und in-vivo als Stopp-Signal erkannt wird (24,25). Die korrekte und effiziente Initiation der Transkription scheint dagegen von spezifischen Proteinfaktoren abhängig zu sein. Diese Proteinfaktoren scheinen weitgehend konserviert zu sein, da die heterologe in-vitro Transkription von Genen, die von der RNA Polymerase III transkribiert werden (Pol III-Gene), beschrieben worden ist (26,27). Bei der Untersuchung des U₆ snRNA Gens aus Maus hat sich jedoch gezeigt, daß dieses Gen nicht mit Extrakten aus Drosophila-Zellen, sondern nur mit solchen aus Mammalia-Zellen zu transkribieren ist (28).

Die von den drei eukaryoten RNA Polymerasen erkannten Promotorstrukturen sind deutlich verschieden:

RNA Polymerase I erkennt Sequenzen, die sich von stromaufwärts (5') der Initiationsstelle (Position -40, bezogen auf den mit +1 bezeichneten Transkriptionsstartpunkt) bis in die transkribierte Sequenz (Position +20) hinein erstrecken. Neben diesem "core"-Promotor findet sich bei den humanen ribosomalen Genen im 5'-flankierenden Bereich (-156 bis -107) eine die Transkriptionsrate modulierende Sequenz (29). Bei anderen Organismen (Xenopus, Drosophila) werden Sequenzelemente beschrieben, die auf die rRNA-Transkription wie die "enhancer"-Sequenzen des RNA Polymerase II-Systems (siehe unten) wirken (7).

Die von der RNA Polymerase II erkannten Promotor-Sequenzen werden in zwei Elemente unterteilt (30):

Direkt vor der Initiationsstelle der Pol II-Gene findet sich der "core"-Promotor, der sich über etwa 100 bp erstreckt und fast immer eine "TATA"-Box (um Position -30 herum) und häufig eine "CCAAT"-Box (meist bei Position -50 bis -70) und / oder eine "GC"-Box aufweist (31,32). Die "TATA"-Box ist für die korrekte Initiation der Transkription notwendig, die "CCAAT"- bzw. die "GC"-Box haben eine modulierende Funktion. Bei

Genen, die in allen Zellen mit relativ niedriger Rate transkribiert werden ("house keeping genes"), findet man oft keine "TATA"-Box (33).

Neben diesen "core"-Promotor-Sequenzen finden sich im RNA Polymerase II-System Sequenzen, die die Transkriptionsrate der Gene stark erhöhen können (34). Für diese "enhancer"-Sequenzen ist gezeigt worden, daß die relative Lage und Orientierung dieser Sequenzen zum Initiationspunkt der Transkription ohne Bedeutung ist, sie sich also auch stromab von der Transkriptionseinheit befinden können (Definition der "enhancer"). Die "enhancer" sind modular aufgebaut. Man findet in ihnen kurze Sequenzbereiche, die sich in vielen Fällen mehrmals wiederholen, wobei leichte Abweichungen innerhalb der Motive auftreten können. Bei isolierter Untersuchung der einzelnen Motive zeigt sich, daß sie in Einzahl kaum eine aktivierende Wirkung haben. Wenn aber mehrmals das gleiche Element vor einen Promotor geschaltet wird, ist eine starke Zunahme der Aktivität der Transkription festzustellen, wie das am Beispiel der "enhancer"-Sequenz aus dem SV40-Genom gezeigt wurde (35 - 37).

Diese Untersuchungen zeigten weiterhin, daß die Auswirkung dieser Elemente oft nur in der lebenden Zelle, also in-vivo, zu beobachten ist. In-vitro-Systeme bieten daher kaum die Möglichkeit, die stimulierende Wirkung einer "enhancer"-Sequenz zu analysieren.

Neben den die Transkriptionsrate eines Pol II-Gens reduzierenden DNA-Sequenzen ("silencer", "blocker", 38) werden im RNA Polymerase II-System auch Sequenzen beschrieben, die für die Regulation der Gene durch (Steroid-) Hormone, Metallionen und Streßfaktoren sowie für die stadien- und gewebespezifische Expression verantwortlich sind (39 - 43). Diese meist flankierenden Sequenzen, die nicht zum "core"-Promotor zu rechnen sind, wirken z.T. wie ein "enhancer".

Die Promotoren der snRNA Gene U₁ bis U_s weisen weder eine "TATA"- noch eine "CCAAT"-Box auf. Dafür findet sich hier ein sogenanntes proximales stimulierendes Sequenzelement (PSE, bei Position -40 bis -70), das zwischen den unterschiedlichen snRNA Genen stark homolog ist, und ein distales stimulierendes Element (DSE, -210 bis -230), das essentiell für die in-vivo Expression der Gene ist und "enhancer"-Wirkung zeigt (17,44). Im DSE der verschiedenen U snRNA Gene finden sich die aus dem SV40-"enhancer" bekannten Oktamer-Motive, aber auch Elemente wie die Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP2 oder die ATF-Faktoren, die die Stimulierbarkeit der nachgeschalteten Promotoren durch cAMP vermitteln können (45). Die Termination der snRNAs ist von dem Vorhandensein einer Sequenz im 3'-Bereich des Gens, der "3'-Box", und von der korrekten Initiation der Transkription abhängig (17).

Die Aktion der "cis-agierenden" DNA-Sequenzen scheint nur über die Interaktion mit spezifischen Proteinfaktoren verständlich, die an diese Sequenzen binden (46) und dann die Transkription beeinflussen. Das Studium der Faktoren, die an die verschiedenen Sequenz-Elemente der SV40-"enhancer"-Sequenz oder auch anderer modulierender Sequenzen binden, zeigt weiterhin, daß in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Faktoren an die gleichen Sequenzen binden können und so eine zellspezifische Regulation der Gene ermöglicht wird (47,48). Diese Studien zeigen weiterhin, daß für die Wirkung der Faktoren auf das zu regulierende Gen nicht nur ihre Bindung an die DNA, sondern auch die Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Faktoren wichtig ist, die an der Regulation eines Gens beteiligt sind. So zeigen Versuche mit dem VP16-Protein (ein starker Transkriptionsaktivator aus dem Herpes simplex Virus, der selber keine DNA-Bindung zeigt), daß es in der Lage ist, sowohl an einen an die "TATA-Box" ("core"-Promotor) bindenden Faktor als auch an einen an das Oktamer-Motiv ("enhancer"-Element) bindenden Faktor zu binden und dadurch die Transkriptionsrate des nachgeschalteten Gens stark zu erhöhen (47). Betrachtet man die Struktur der bekannten Transkriptionsfaktoren, die an "cis-regulierende" DNA-Sequenzen binden, so erkennt man, daß diese Proteine in der Regel zwei funktionelle Domänen aufweisen. Neben der DNA-Bindungsdomäne ist eine Domäne zu erkennen, die für die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren (oder der RNA Polymerase) wichtig ist. Diese Interaktionsdomäne ist oft durch eine amphipathische α -Helix gekennzeichnet (49), zeigt also eine stark asymmetrische Ladungsverteilung mit den negativ geladenen Resten der Aminosäuren auf einer Seite der Helix. Die DNA-Bindungsdomäne der bisher bekannten Transkriptionsfaktoren ist meist entweder dem "helix-turn-helix"-Motiv zuzuordnen, wie z.B. bei den an die Oktamer-Sequenz vieler "enhancer" bindenden OTF-Faktoren (1,2,47), oder sie besteht aus mehreren "Zink-Fingern", wie das Beispiel der Steroid-Hormonrezeptoren zeigt. Ein weiteres DNA-Bindungs-Motiv scheint die als "leucine-zipper" bezeichnete Struktur mehrerer Proteine darzustellen, die z.T. von Onkogenen kodiert werden (2). Eine vierte Klasse von DNA-Bindungsdomänen wurde bei den "Pax 1"-Proteinen (kodiert von Segmentierungs-Genen bei Drosophila) beschrieben (1).

Die Struktur der Promotor-Sequenzen der Pol III-Gene ist recht komplex (21 - 23,50,51). So ist der Promotor der tRNA Gene in zwei absolut notwendige geninterne Sequenzen aufgeteilt, die beide etwa 10 Basenpaare (bp) lang sind. Diese als "A-Box" (+8 bis +19) bzw. "B-Box" (+52 bis +62) bezeichneten Sequenzen sind in allen bisher untersuchten tRNA Genen

gefunden worden. Auch die viralen Gene für die VA-RNAs bzw. EBER-RNAs weisen einen solchen geteilten intragenischen Promotor auf. Im 5S rRNA Gen besteht der geninterne Promotor aus einer etwa 40 bp langen Sequenz, der Internen Kontroll-Region oder "ICR". Die "ICR"-Sequenz kann in drei Bereiche unterteilt werden, eine der A-Box der tRNA Gene homologe Sequenz (+ 50 bis +64) sowie in zwei spezifische Sequenzen, dem intermediären Element (+ 67 - +72) und der C-Box (+80 - +97).

Auch für Pol III-Gene wurde die Modulation der Transkription durch 5'-flankierende Sequenzen beschrieben, die entweder einen reduzierenden oder einen erhöhenden Einfluß auf die Transkriptionsrate haben können (21). So haben Ullu et al. 1985 für das 7S L RNA Gen gezeigt, daß zur korrekten und effizienten in-vitro und in-vivo Transkription des 7S L Gens die 5'-flankierende genomische Sequenz von großer Bedeutung ist (52). Auch bei tRNA Genen wurde der modulierende Einfluß der 5'- wie auch der 3'-flankierenden Sequenz auf die Rate der Transkription dieser Gene beschrieben (53). Parallel zu meinen Untersuchungen zur Regulation der 7S K RNA Transkription zeigten in-vitro und in-vivo Studien mit dem U₆ snRNA Gen verschiedener Spezies, daß die 5'-flankierende Sequenz dieses Pol III-Gens völlig ausreichend ist, um die Transkription zu ermöglichen; das U₆ Gen besitzt keine internen Promotor-Sequenzen (54). Der 5'-flankierende Bereich des U₆ Gens zeigt Sequenzelemente, die sonst bei Pol II-Genen zu finden sind, so eine "TATA"-Box bei Position -20 bis -30, die für die Transkription durch die RNA Polymerase III essentiell ist, sowie eine PSE- und eine DSE-Sequenz, die denen der anderen snRNA Gen-Promotoren recht homolog ist (17). Diese DSE-Sequenz enthält ein Oktamer-Motiv, das für die in-vivo Expression unverzichtbar ist. Diese "enhancer"-Sequenz kann funktionell durch die des U₂ snRNA Gens (Pol II-System) ersetzt werden (55,56). Neuere Untersuchungen zeigen weiterhin, daß das U₆ Gen auch von der RNA Polymerase II transkribiert werden kann; es entstehen dabei zu lange, unkorrekt terminierte Transkripte, deren Bedeutung nicht bekannt ist (17,57).

Neben Untersuchungen auf der Ebene der DNA haben auch Analysen der Transkriptionsfaktoren des RNA Polymerase III-Systems zum Verständnis der Kontrolle der Genexpression beigetragen. Die Fraktionierung von Zell-extrakten und die in-vitro Transkription spezifischer Gensequenzen mit vorgereinigten Faktoren haben gezeigt, daß neben der RNA Polymerase III selbst noch mindestens zwei weitere Faktoren (TF III B und TF III C) zur Transkription der untersuchten Pol III-Gene (tRNA Gene) notwendig sind (21,58,59). Im Fall des 5S rRNA Gens ist ein weiterer genspezifischer

Faktor, TF III A, beschrieben worden, der mittlerweile bis zur Homogenität aufgereinigt wurde (21,60,61). Dieses etwa 40 kD große "Finger"-Protein (62) bindet an die ICR-Sequenz im Bereich +47 bis +97.

TF III C bindet bei der Transkription der tRNA Gene an deren B-Box-Element, TF III B zeigt selbst keine DNA-Bindungsaktivität, sondern bindet an die Komplexe aus DNA und TF III A bzw. TF III C.

Die anderen Faktoren, die an der Transkription durch die RNA Polymerase III beteiligt sind und z.T. an die 5'- oder 3'-flankierenden Sequenzen binden, sind noch nicht gut charakterisiert.

Als Modellsystem zur Untersuchung der Regulation der Genexpression in Eukaryoten wurde in der Arbeitsgruppe Benecke das RNA Polymerase III-System des Menschen ausgewählt, speziell die Regulation der Expression der Gene der beiden scRNAs 7S K und 7S L. Die Konzentration dieser scRNAs in der Zelle ist so hoch, daß hier besonders effektive Kontroll- und Synthesemechanismen zu erwarten sind.

Die 299 nt lange 7S L RNA ist Bestandteil des sogenannten Signal-Erkennungs-Partikels ("signal recognition particle", SRP), das für die gerichtete Translokation von Export- und Membranproteinen am rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) verantwortlich ist (63). Sequenzdaten zeigen, daß die 7S L RNA homolog zu einer hochrepetitiven Sequenz des humanen Genoms (300.000 Kopien) ist, die als "Alu"-Sequenz bezeichnet wird (64).

Über die Rolle der 7S K RNA in der Zelle ist noch nichts bekannt. Hinsichtlich ihrer Lokalisation in der Zelle gibt es widersprüchliche Daten (65). Es gibt Befunde, die auf eine Beteiligung der 7S K RNA an der Transkription im Zellkern hindeuten (66); andere Daten belegen eine Assoziation mit den Polysomen im Cytoplasma (67). Für die cytoplasmatische Lokalisation spricht die Isolierung der 7S K RNA aus einem etwa 13S großen Ribonukleoprotein-Partikel des Cytoplasmas.

Bei der Isolierung der beiden humanen 7S RNA Gene aus einer menschlichen Genbank stellte sich heraus, daß im humanen Genom neben den aktiven Genen sehr viele verstümmelte Pseudogene vorhanden sind, die entweder über Rekombinationsmechanismen bzw. falsche Replikation entstanden sein können oder durch die reverse Transkription der RNAs, also Retro-Transposons darstellen (68 - 72).

Durch fortschreitende Deletion der 5'-flankierenden DNA-Sequenz des 7S K Gens und in-vitro Transkription der erhaltenen Konstrukte hatte W. Krüger gezeigt, daß für die in-vitro Expression des 7S K Gens die proximale 5'-flankierende Sequenz (bis Position -67) essentiell ist (71,73).

Die vorliegende Arbeit befaßt sich nun mit Studien zur Regulation der Expression der beiden menschlichen 7S RNA Gene. Ziel der Arbeit war es, diejenigen DNA-Sequenzen, die für die Expression der 7S Gene in-vitro und in-vivo essentiell sind, genauer einzugrenzen.

2. Materialien:

2.1. Herkunft der verwendeten Chemikalien:

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar-Agar	Serva, Heidelberg
Agarose	Sigma, Taufkirchen
α -Amanitin	Boehringer, Mannheim
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Bactoagar	Gibco-BRL, Eggenstein
Bis	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Caseinhydrolysat (Pepton Nr. 140)	Gibco-BRL, Eggenstein
Desoxynukleotide	Pharmacia, Freiburg
Didesoxynukleotide	Pharmacia, Freiburg
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ficoll 400	Pharmacia, Freiburg
Hefe-Extrakt	Gibco-BRL, Eggenstein
HEPES	Serva, Heidelberg
8-Hydroxychinolin	Serva, Heidelberg
Lachs-Sperma-DNA	Sigma, Taufkirchen
Lauroylsarkosin	Serva, Heidelberg
M13-Sequenzierungsprimer (17mer)	Pharmacia, Freiburg
NA 45 Membran	Schleicher & Schüll, Dassel
PIPES	Serva, Heidelberg
Polyethylenglycol	Serva, Heidelberg
Polyvinylpyrrolidon	Sigma, Taufkirchen
radioaktiv markierte Nukleotide	NEN, Dreieich
Ribonukleotide	Sigma, Taufkirchen
Rinderserumalbumin	Sigma, Taufkirchen
Spermidin	Serva, Heidelberg
TEMED	Bio-Rad, München
Tetracyclin	Sigma, Taufkirchen
tRNA	Boehringer, Mannheim
VRC	Gibco-BRL, Eggenstein
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

Alle anderen Chemikalien wurden von den Firmen Baker, Fluka, Merck, Riedel de Haën und Roth bezogen.

2.2. Herkunft der verwendeten Enzyme:

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (EC 3.1.3.1)	Boehringer, Mannheim
E.coli DNA-Polymerase (Klenow- Fragment) (EC 2.7.7.7)	Boehringer, Mannheim
Exonuklease Bal 31	Boehringer, Mannheim
Lysozym (EC 3.2.1.17)	Fluka, Neu-Ulm
	Serva, Heidelberg
Mung Bohnen Nuklease	Pharmacia, Freiburg
Proteinase K (EC 3.4.21.14)	Merck, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	Bio-Labs, Schwalbach
	Boehringer, Mannheim
	Gibco-BRL, Eggenstein
	Pharmacia, Freiburg
	Serva, Heidelberg
RNase A (EC 3.1.27.5)	Pharmacia, Freiburg
S ₁ -Nuklease (EC 3.1.30.1)	Boehringer, Mannheim
T4-DNA-Ligase (EC 6.5.1.1)	Pharmacia, Freiburg
	Pharmacia, Freiburg
T4-Polynukleotid-Kinase (EC 2.7.1.78)	Bio-Labs, Schwalbach
T7-DNA-Polymerase (EC 2.7.7.7)	Pharmacia, Freiburg

3. Experimentelle Methoden:

3.1. HeLa S3-Zellen:

In der vorliegenden Arbeit wurde überwiegend die menschliche Zelllinie HeLa S3 eingesetzt.

HeLa-Zellen sind ihrer Morphologie und Herkunft nach Epithel-Zellen und entstammen einem menschlichen Zervix Karzinom. Sie waren die ersten aneuploiden Zellen, die aus einem menschlichen Gewebe isoliert und dann permanent in Kultur gehalten wurden. Diese Zelllinie wurde von G.O. Gey et al. isoliert (74). HeLa S3 Zellen sind nun ein besonders widerstandsfähiger Subklon, der 1955 von Puck et al. (75) etabliert wurde.

Als einschichtiger Zellrasen ("Monolayer"-Kultur) wuchsen sie in Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium (DMEM, 76) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS). Die Kulturen wurden bei Anwesenheit von 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Bei Suspensionskulturen wurde Minimal-Essential-Medium (MEM, modifiziert nach Joklik, 77) verwandt, das mit 5 % Serum aus neugeborenen Kälbern (NCS) versetzt wurde.

3.2. In-vitro Transkription isolierter Gensequenzen in zellfreien Extrakten:

3.2.1. Präparation des S100-Zell-Extraktes:

Die Präparation des für die in-vitro Transkription verwandten S100-Extraktes erfolgte mit kleinen Modifikationen nach der von Weil et al. (26) beschriebenen Methode.

Alle Schritte erfolgten bei 4°C.

HeLa S3-Zellen wurden durch Zentrifugation im GSA-Rotor (1000 rpm, 170x g, 10 min) geerntet und in 1/10 Volumen an isotonem Earles-Puffer (78) resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (Heraeus-Christ Minifuge GL, 750x g, 1800 rpm, 10 min) erfolgte die Bestimmung des Volumens des Zell-Sedimentes ("PCV", "packed cell volume"). Nach Aufnahme der Zellen in 5 "PCV" an Puffer A erfolgte ein Schwellen der Zellen für 10 min, an das sich eine weitere Zentrifugation in der Minifuge anschloß. Das Zellsediment wurde dann in 2 "PCV" Puffer A resuspendiert und die Zellen daraufhin im Dounce-Homogenisator durch 15 bis 20 kräftige Stöße mit dem B-Pistill lysiert. Nach Kontrolle der Lysis im Phasenkontrast-Mikroskop wurde dem Homogenat 1/11 des Gesamtvolumens an Puffer B zugesetzt und dann im SW 60-Rotor (32000 rpm, 100000x g, 1 h) zentrifugiert. Nach Abnahme der oben aufliegenden Lipidschicht gelangte der Überstand der Zentrifugation dann zur Dialyse gegen 100 Volumen an Puffer D (dreimal je 1,5 h). Nach einer Zentrifugation des Dialysats im HB4-Rotor

(8000 rpm, 20 min, 10000x g) konnte der S100-Extrakt dann in Aliquots von 200 μ l in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Der bei -70°C gelagerte Extrakt war mindestens 6 Monate aktiv.

Puffer A:

10 mM HEPES/KOH pH 7,9
1,5 mM MgCl_2
10 mM KCl
0,5 mM DTT

Puffer B:

0,3 M HEPES/KOH pH 7,9
1,4 M NaCl
30 mM MgCl_2

Puffer D:

20 mM HEPES/KOH pH 7,9
0,1 M KCl
0,5 mM DTT
0,2 mM EDTA
20 % Glyzerin

3.2.2. In-vitro Transkription mit Zell-Extrakten:

3.2.2.1. In-vitro Transkription unter Einsatz von α - ^{32}P -UTP zur direkten Markierung der Transkripte:

Die in-vitro Transkription erfolgte, wie von Weil et al. (26) beschrieben, in einem Reaktionsvolumen von 50 μ l. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

16 mM HEPES/KOH pH 7,9
70 mM KCl
5 mM MgCl_2 (1,5 mM bei 7S L Promotorsequenzen)
0,5 mM DTT
0,6 mM ATP, GTP, CTP
1 $\mu\text{g/ml}$ α -Amanitin
5-10 μCi α - ^{32}P -UTP (600 Ci/ μmol)
20 μ l S100-Extrakt
1,5 μg exogene DNA

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Extraktes gestartet und der Ansatz für 60 min bei 30°C inkubiert. Nach Zugabe des Stoppuffers erfolgte eine weitere Inkubation für 60 min bei 30°C . Nach Phenolextraktion (siehe 3.5.1.) des Ansatzes wurde die wässrige Phase mit 10 μg tRNA und 2,5 M NH_4Ac (Endkonzentration) versetzt und die Nukleinsäuren durch Zugabe

von 2,5 Volumen Ethanol ausgefällt. Nach 15 min bei -70°C (2 h bei -20°C) erfolgte eine Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge für 15 min (9000 rpm, 10000x g). Das Sediment wurde in 200 μl TE-SDS-Puffer aufgenommen und die Nukleinsäuren nach Zusatz von 2,5 M NH_4Ac und 2,5 Volumen Ethanol wiederum ausgefällt. Wieder erfolgte eine Inkubation der Fällung bei -70°C für 15 min und das Präzipitat wurde wieder durch Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge sedimentiert. Nach Waschen mit 70 % Ethanol und Rezentrifugation wurde das Sediment getrocknet und dann in 4 μl hochreinem H_2O aufgenommen. Nach Zugabe von 12 μl Formamid-Probenpuffer und Denaturierung der Nukleinsäuren bei 95°C für 5 min erfolgte dann eine Analyse der Proben in einem denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoff-Gel.

Stoppuffer:

10 mM Tris/HCl pH 7,4
10 mM NaCl
0,5 % SDS
500 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K

TE-SDS-Puffer:

10 mM Tris/HCl pH 7,9
0,1 mM EDTA
0,2 % SDS

Formamid-Probenpuffer/FA-Puffer:

90 % Formamid (entionisiert, 2x umkristallisiert)
1x TEB
0,02 % Bromphenolblau; 0,02 % Xylencyanol

3.2.2.2. In-vitro Transkription zur S₁-Analyse (79):

Bei der in-vitro Transkription zur S₁-Analyse enthielt der Ansatz statt α - ^{32}P -UTP nicht radioaktiv markiertes UTP (0,6 mM, bei Einsatz radioaktiv markierter DNA siehe 3.4.). Die eigentliche in-vitro Transkription wurde, wie unter 3.2.2.1. beschrieben, durchgeführt, jedoch erfolgte nach der Beendigung der Reaktion eine DNase-Verdauung für 45 min bei 30°C in Gegenwart des RNase-Inhibitors Vanadyl-Ribonukleosid-Komplex (VRC; Endkonzentration: 11 mM VRC, 0,4 mg/ml DNase I) zur Verdauung der eingesetzten DNA-Matrize und der DNA aus dem Extrakt. Durch Zugabe von Proteinase K (0,3 mg/ml Endkonzentration) und N-Lauroylsarkosin (LS; Endkonzentration 0,3 %) wurde die Reaktion beendet. Nach weiteren 60 min bei 30°C wurden die Ansätze mit Extraktionspuffer auf 200 μl aufgefüllt und Phenol-extrahiert. Dabei wurde zuerst ein Volumen Phenol-Lösung und ein Volumen Chloroform-Lösung zugefügt. Nach Mischen auf dem Vortex-Mischer und Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge wurde die wässrige Phase in ein neues Probengefäß überführt. Die organische Phase

wurde mit 200 µl Extraktionspuffer reextrahiert und die beiden wässrigen Phasen vereinigt. Diese wurde mit einem Volumen Chloroform-Lösung versetzt, der Ansatz auf dem Vortex-Mischer gemischt und in der Eppendorf-zentrifuge zentrifugiert. Nach weiterer Überführung der wässrigen Phase in ein anderes Probengefäß wurden die Nukleinsäuren mit 2,5 Volumen Ethanol gefällt. Nach 15 min bei -70°C (2 h bei -20°C) erfolgte eine Zentrifugation der Ansätze im SE12-Rotor (13500 rpm, 12000x g, 15 min). Das Sediment wurde in 400 µl ELAT-Puffer aufgenommen und dann wieder 2,5 Volumen Ethanol zugefügt. Diese Fällung verblieb wiederum 15 min bei -70°C (2 h bei -20°C), und die Nukleinsäuren wurden dann erneut im SE12-Rotor gesammelt. Die so gereinigten Nukleinsäuren wurden in 200 µl AL-Puffer aufgenommen, nochmals gefällt und zur Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten eingesetzt (siehe 3.7.).

Extraktionspuffer:

50 mM NaAc pH 4,5
150 mM NaCl
0,6 % N-Lauroylsarkosin (LS)
10 µg/ml tRNA

ELAT-Puffer:

2 M NH₄Ac
50 mM EDTA
0,1 % LS
25 µg/ml tRNA

AL-Puffer:

1 M NH₄Ac
0,1 % LS

3.3. Transfektion von Zellkulturzellen und Isolation von RNA aus den transfizierten Zellen:

3.3.1. Transfektion von Zellkultur-Zellen:

Subkonfluente Kulturen von HeLa-Zellen wurden mit superhelikaler Plasmid-DNA gemäß einer Modifikation der Kalziumphosphat/DNA-Kopräzipitations-Methode nach Graham et al. (80) transfiziert. Dazu wurden etwa 20 Stunden vor der Transfektion etwa 10⁶ Zellen auf Gewebekulturschalen mit 8 cm Durchmesser ausplattiert. Drei Stunden vor der Zugabe der DNA wurde das Medium durch 8 ml frisches Medium ersetzt. Die zur Ausbildung des Präzipitats notwendigen Lösungen wurden auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Ausbildung des Präzipitats wurden 500 µl HBS-Lösung in Eppendorfreaktionsgefäßen vorgelegt. In einem weiteren Eppendorfreaktionsgefäß wurden 25 µg Plasmid-DNA mit 62 µl 2M CaCl₂-Lösung versetzt und dann das Volumen mit 10 mM Tris/HCl-Lösung von pH 7,6 auf 500 µl aufgefüllt. Bei Transfektionsansätzen mit Kontroll-Plasmiden enthielt dieses

Gemisch zusätzlich 12,5 µg Kontroll-Plasmid. Das Gemisch aus DNA, CaCl₂ und Tris/HCl wurde unter Mischen auf einem Vortex-Mixer (Stufe 4 bis 5) zu der HBS-Lösung tropfenweise zugefügt. Das so gebildete Präzipitat wurde 30 Minuten erschütterungsfrei bei RT aufbewahrt und dann unter leichtem Umschütteln der Kulturplatte auf die Zellen aufgetropft, wobei darauf zu achten war, daß sich das Präzipitat mit dem Medium sofort durchmischte. Nach drei Stunden wurde das Präzipitat im Mikroskop überprüft. Vier Stunden nach dem Auftropfen wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS-Lösung gewaschen und dann mit 3 ml Schocklösung versetzt. Nach etwa 3 Minuten wurde die Schocklösung entfernt, die Zellen zweimal mit PBS-Lösung gewaschen und dann 8 ml frisches Medium zugegeben. Sowohl die PBS-Lösung als auch die Schock-Lösung und das Kultur-Medium wurden vor dem Schock auf 37°C erwärmt. Zur Expression der eingeschleusten DNA wurden die Zellen nach der Transfektion 24 bis 48 Stunden in einem Warmluft-Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

CaCl₂-Lösung:

2 M CaCl₂

HBS-Lösung:

50 mM HEPES

1,5 mM Na₂HPO₄

280 mM NaCl

pH 7,13

Schock-Lösung:

50 % HBS

15 % Glycerin

Tris/HCl-Lösung:

10 mM Tris

pH 7,6 mit HCl

20x PBS-Lösung:

3,08 M NaCl

0,4 M KH₂PO₄

0,16 M Na₂HPO₄ x 2H₂O

(Später wurde bei in-vivo Experimenten das Präzipitat 16 Stunden auf den Zellen belassen, kein Glycerin-Schock durchgeführt, sondern nach Waschen der Zellen mit PBS-Lösung frisches Medium mit Serum zugefügt. Für dieses Verfahren ist eine höhere Transfektionsrate beschrieben worden (81).)

3.3.2. Isolierung von RNA aus Zellkultur-Zellen:

Die Isolierung von RNA aus "Monolayer"-Zellen erfolgte mit Modifikationen nach einer von Davis et al. (82) beschriebenen Methode.

Nach Entfernung des Kulturmediums wurde zu jeder Gewebekulturplatte 3 bis 4 ml Earles-Puffer vorsichtig zugefügt und nach vorsichtigem Umschwenken der Puffer wieder abgenommen. Zur Lysis der Zellen erfolgte

dann die Zugabe von 2 ml GIT-Puffer. Nach Umschwenken der Kultur-Platte und Abkratzen der Zell-Reste mit einem Gummischaber wurde das Lysat in SW60-Röhrchen übertragen, die 1,5 ml CsCl-Puffer enthielten. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation im SW60-Rotor für 16 h (33000 rpm, 100000x g, 22°C). Der Überstand der Zentrifugation wurde dekantiert und das Sediment in 200 µl TEL-Puffer gelöst. Die so erhaltene RNA-Lösung wurde in Eppendorfgefäßen mit 200 µl Chloroform/1-Butanol-Lösung (4:1) versetzt. Nach Mischen auf dem Vortex-Mixer und einer Zentrifugation in der Eppendorfsentrifuge (9000 rpm, 10 min) wurde die wässrige Phase in neue Reaktionsgefäße überführt. Die organische Phase wurde mit 200 µl TEL-Puffer reextrahiert. Die wässrigen Lösungen wurden vereinigt und mit 50 µl 8 M LiCl und 2,5 Volumen Ethanol versetzt, um die gereinigte RNA auszufällen. Nach 15 min bei -70°C erfolgte eine Zentrifugation im SE12-Rotor (13500 rpm, 12000x g, 4°C) für 20 min. Das RNA-Sediment wurde dann einmal mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknen des Sediments die RNA in 300 µl TEL-Puffer aufgenommen. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm wurde ein Aliquot der Lösung, das 20 µg RNA enthielt, mit NH₄Ac versetzt (Endkonzentration 1 M) und dann der Ansatz mit hochreinem H₂O auf 400 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol wurde die gereinigte RNA zusammen mit den radioaktiv markierten DNA-Fragmenten erneut ausgefällt (siehe 3.4.).

GIT-Puffer:

4 M Guanidiniumthiocyanat
25 mM NaAc
0,85 % 2 Mercapto-Ethanol

CsCl-Puffer:

5,7 M CsCl
25 mM NaAc

TEL-Puffer:

10 mM Tris/HCl pH 7,4
5 mM EDTA
1 % LS

3.3.3. Extrakt-Präparation aus transfektierten Zellen zur Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität:

Neben der Analyse der RNA aus transfizierten Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Methode des "CAT-Assay" angewandt (83). Bei dieser Methode wird die auf ihre Wirkung als "enhancer" zu untersuchende DNA-Sequenz in einen Vektor (pA10CAT, 84) eingefügt, der neben dem SV40-Promotor auch das Gen für die Chloramphenicol-Acetyltrans-

ferase enthält. Weiterhin liefert dieser Vektor eine Sequenz, die durch die "splicing"-Enzyme der Zelle erkannt wird (vom kleinen t-Antigen des SV40-Virus) und eine Polyadenylierungsstelle. Als Kontrolle dient ein Plasmid (pSV2CAT, 83), welches auch noch die "enhancer"-Sequenz aus SV40 enthält. In den transfizierten Zellen wird nun die Chloramphenicol-Acetyltransferase gebildet, die in Zellextrakten bestimmt werden kann.

3.3.3.1. Präparation des "CAT"-Extraktes:

Bei der Präparation wurde mit leichten Modifikationen nach der Methode von Gorman et al. (83) vorgegangen.

Das Medium der Zellkulturplatten wurde entfernt und die Zellen dann mit 4 ml Earles-Puffer gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe von 2 ml TEN-Puffer und eine Inkubation der Platten bei 0°C für 5 min. Die Zellen wurden von den Platten mit Hilfe eines Gummischabers abgelöst und in ein 15 ml Corex-Glas überführt. Die Platte wurde mit 2 ml TEN-Puffer nachgespült und die Suspensionen vereinigt. Nach Zentrifugation in der Minifuge (2500 rpm, 10 min, 4°C) wurde das Zellsediment in 400 µl TEN-Puffer aufgenommen und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation in der Eppendorfzentrifuge für 45 sec (9000 rpm, RT) erfolgte die Resuspension des Sediments in 200 µl 250 mM Tris/HCl pH 7,9. Die Suspension wurde dann in ein Ethanol/Trockeneisbad (-80°C) überführt und dort so lange inkubiert, bis sie ganz durchgefroren war. Nach 3 min bei 37°C wurde die Suspension dann gut auf dem Vortexmischer gemischt. Dieser Vorgang (Einfrieren, Auftauen, Mischen) erfolgte dreimal. Danach wurde das Lysat 5 min in der Eppendorfzentrifuge zentrifugiert (9000 rpm, 10000x g, RT) und der Überstand, der das "CAT"-Enzym enthielt, abgenommen. Nach Schockgefrieren in flüssigem N₂ konnte der Extrakt bei -70°C gelagert werden und war so mindestens 3 Monate stabil.

TEN-Puffer:

40 mM Tris/HCl pH 7,5

1 mM EDTA

150 mM NaCl

3.3.3.2. Bestimmung der "CAT"-Aktivität:

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration im Extrakt nach der Methode von Bradford (85) wurde der folgende Ansatz angesetzt:

200 µg Extraktprotein
 20 µl 4 mM Coenzym A
 1 µl ^{14}C -Chloramphenicol (53 mCi/mmol)
 ad 200 µl mit 250 mM Tris/HCl pH 7,9

Nach 1 h bei 37°C wurde dem Ansatz 200 µl Ethylacetat zugefügt und dann gut auf dem Vortex-Mixer durchmischt. Nach einer Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge (9000 rpm, RT, 5 min) wurde die obere (organische) Phase mit den Reaktionsprodukten abgenommen. Nach Lyophilisierung des Ansatzes wurde das Material in 20 µl Ethylacetat aufgenommen und in Aliquots von 1,5 µl auf eine Kieselgel-Dünnschicht-Platte aufgetragen. Nach aufsteigender Flüssigkeits-Chromatographie (Laufmittel: 95 % CHCl_3 , 5 % Methanol) wurde die Platte an der Luft getrocknet und ein Röntgenfilm aufgelegt. Nach 1 bis 2 Tagen bei RT konnte der Film dann entwickelt werden. Die "CAT"-Aktivität der Extrakte konnte durch Radioaktivitätsbestimmung ermittelt werden.

3.4. S₁-Kartierung von Transkripten:

Zur genaueren Analyse der in-vitro und in-vivo synthetisierten Transkripte wurde die Methode der S₁-Verdauungs-Schutz-Analyse angewandt (86,87). Mit dieser Methode ist man in der Lage, sowohl die Spezifität eines Transkriptes als auch den genauen Startpunkt der RNA-Synthese festzustellen. Weiterhin ist, bedingt durch die hohe spezifische Aktivität der radioaktiv markierten DNA-Fragmente, die Nachweisgrenze der Methode sehr niedrig.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl radioaktiv markierte DNA-Fragmente zur Hybridisierung mit unmarkierter RNA als auch unmarkierte DNA-Fragmente zur Hybridisierung mit radioaktiv markierter RNA eingesetzt. Bei radioaktiv markierten DNA-Fragmenten gelangten zumeist am 5'-Ende markierte DNAs zum Einsatz.

3.4.1. Hybridisierung:

Die gefällten Nukleinsäuren (aus 3.2.2.2. oder 3.3.3.) wurden in der Eppendorffzentrifuge sedimentiert (9000x g, 15 min, RT) und nach Waschen und Trocknen in 30 µl Hybridisierungspuffer gelöst. Nach Denaturierung bei 85°C für 30 min erfolgte die Hybridisierung für mindestens 6 Stunden bei 52°C (zumeist über Nacht), wobei submers hybridisiert wurde.

3.4.2. S₁-Verdauung:

Dem Hybridisierungsansatz wurden bei der Hybridisierungstemperatur 300 µl S₁-Verdauungspuffer zugefügt, der die S₁-Nuklease enthielt. Nach Mischen des Ansatzes durch mehrmaliges Aufziehen mit einer automatischen Pipette wurde für 15 min in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 65 µl S₁-Stoppuffer beendet. Zur Reinigung der geschützten Moleküle erfolgte eine Phenolextraktion (siehe 3.2.2.2. ohne Reextraktion der organischen Phase). Nach Fällung, Zentrifugation, Waschen und Trocknen wurden die Nukleinsäuren in 4 µl hochreinem H₂O aufgenommen. Nach Zugabe von 3 Volumen FA-Puffer und Denaturierung durch Erhitzen für 5 min bei 95°C konnten die Proben dann auf Polyacrylamid-Harnstoffgele aufgetragen werden.

Hybridisierungs-Puffer:

40 mM PIPES/NaOH pH 6,4
400 mM NaCl
1 mM EDTA
80 % Formamid

S₁-Verdauungs-Puffer:

280 mM NaCl
30 mM NaAc pH 4,5
4,5 mM Zn(Ac)₂
30 µg/ml Herings-Sperma-DNA
300 U/ml S₁-Nuklease

S₁-Stoppuffer:

2,5 M NH₄Ac
50 mM EDTA

3.5. Subklonierungen von DNA-Molekülen:

3.5.1. Restriktion von DNA-Molekülen:

Bei der Verdauung von DNA-Molekülen mit Restriktionsendonukleasen erfolgte die Inkubation der DNA mit den Enzymen nach den Angaben der Hersteller. Bei präparativen Ansätzen geschah die Verdauung zumeist über Nacht, die Vollständigkeit der Verdauung wurde durch Analyse in Agarosegelen überprüft. Dann erfolgte entweder eine präparative Auftrennung des Verdauungsansatzes in Agarosegelen (Isolierung von DNA-Fragmenten, siehe 3.8.1.2.), oder der Ansatz wurde durch Phenolextraktion (88) gereinigt. Dabei wurde der Ansatz zuerst auf 0,3 M NaAc gebracht und 1 Volumen Phenol-Lösung sowie 1 Volumen Chloroform-Lösung zugegeben. Nach Durchmischen wurde der Ansatz zentrifugiert (9000 rpm, 1 min) und dann die organische Phase verworfen. Der wässrigen Phase wurde dann 1 Volumen Chloroform-Lösung zugefügt, wieder durchgemischt und rezentrifugiert. Nach Entfernen der organischen Phase wurde der Ansatz noch ein-

mal kurz anzentrifugiert, die wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die restringierte DNA durch Zugabe von 2,5 Volumen absolutem Ethanol gefällt. Entstand bei der Extraktion der wässrigen Phase eine deutlich sichtbare Interphase, so wurde die Extraktion so lange wiederholt, bis keine Interphase mehr zu erkennen war. Nach 2 h bei -20°C (oder 15 min bei -70°C) erfolgte dann eine Zentrifugation in der Eppendorfschleuse. Das Nukleinsäuresediment wurde nach Waschen und Trocknen in TE-Puffer aufgenommen.

Phenol-Lösung:

500 ml destilliertes Phenol
70 ml m-Kresol
225 ml H_2O bidest
0,5 g 8-Hydroxychinolin

Chloroform-Lösung:

99 % Chloroform
1 % Isoamylalkohol

TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl pH 7,9
0,1 mM EDTA

3.5.2. Phosphatase-Behandlung:

Nach Verdauung der Vektor-DNA (pSPT19 (89), pAT153 (90), pBluescript (91), M13mp18, pUC-Vektoren (92)) mit den geeigneten Restriktionsenzymen erfolgte entweder direkt oder nach Aufnahme der gereinigten DNA in Phosphatase-Puffer die Behandlung der Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm. Dazu wurde mit 1 U pro pmol Enden bei 37°C für 1 h verdaut. Diese Behandlung verhindert später weitgehend die Religation des Vektors (93). Der Ansatz wurde dann entweder in einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt und die Vektor-DNA nach dem im 3.8.1.2. beschriebenen Verfahren isoliert, oder die Phosphatasereaktion wurde durch Zugabe von 10 mM EGTA (Endkonzentration) und Phenolextraktion beendet. Nach Zugabe von NaAc (0,3 M Endkonzentration) und Ethanol (2,5 Volumen) konnte die restringierte und dephosphorylierte DNA gefällt werden. Nach Zentrifugation, Waschen und Trocknen wurde die DNA in TE-Puffer aufgenommen.

Phosphatase-Puffer:

50 mM Tris/HCl pH 9; 0,1 mM EDTA

3.5.3. Auffüllreaktion (94):

Waren bei Klonierungen 5'-überhängende DNA-Enden in stumpfe Enden ("blunt ends") zu überführen, wurde die DNA nach der Restriktion, Phenolextraktion und Fällung in hochreinem H₂O aufgenommen und die überhängenden Enden dann mit Hilfe des Klenow-Enzyms in folgendem Ansatz aufgefüllt :

0,5 - 2 µg DNA
 2 µl "core"-Puffer (10x)
 4 µl 2mM dATP/dCTP/dGTP/dTTP
 1 µl Klenow-Enzym (5 U/µl)
 ad 20 µl mit H₂O

(10x "core"-Puffer: 500 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM MgCl₂; 500 mM NaCl)

Die Inkubation erfolgte bei 22 bis 37°C für 30 bis 60 min. Der Ansatz wurde entweder in einem Agarose-Gel aufgetrennt und die gewünschten DNA-Fragmente dann wie in 3.8.1.2. beschrieben isoliert, oder die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 75°C für 15 min und Phenolextraktion beendet. Nach Fällung mit Ethanol, Zentrifugation, Waschen und Trocknen konnte die DNA dann in TE aufgenommen werden.

3.5.4. Abbauen der Enden mit Mung Bohnen Nuklease:

Sollten 3'-überhängende DNA-Enden in stumpfe Enden überführt werden oder waren 5'-überhängende Enden so in stumpfe Enden zu überführen, daß dabei gezielt einige Nukleotide entfernt wurden, erfolgte eine Inkubation der DNA mit Exonuklease aus Mung Bohnen Keimlingen (95). Dabei wurde die restringierte und gereinigte DNA in MB-Verdauungspuffer aufgenommen (0,1 µg DNA /µl) und dann 0,5 bis 1 Einheit Mung Bohnen Nuklease pro µg DNA zugesetzt. Die Verdauung erfolgte bei 30°C für 30 min. Die Reinigung der DNA erfolgte wie oben beschrieben.

MB-Verdauungspuffer:

50 mM NaAC pH 5
 30 mM NaCl
 1 mM ZnSO₄

3.5.5. Verdauung von DNA-Molekülen mit der Exonuklease Bal 31:

Vor der Verdauung der Exonuklease Bal 31 wurde die DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym restringiert, um einen definierten Anfangs-

punkt zu erhalten. Die gereinigte DNA wurde dann in Bal 31-Verdauungspuffer aufgenommen.

Die Verdauung mit der Exonuklease Bal 31 geschah nach den Angaben des Herstellers in Übereinstimmung mit dem von Maniatis (94) beschriebenen Verfahren, wobei meist 7,5 Einheiten Bal 31-Exonuklease pro 50 pmol linearisiertem Plasmid eingesetzt wurden. In Abhängigkeit von der Zahl an Nukleotiden, die abgedaut werden sollten, wurden dem Reaktionsgemisch zu unterschiedlichen Zeitpunkten Aliquots entnommen. Durch Zugabe von 1/4 Volumen EGTA und Phenolextraktion wurde die Verdauung beendet. Die Enden der gereinigten DNA wurden mit Hilfe des Klenow-Enzyms (3.5.3.) aufgefüllt. Durch Nachrestriktion mit einem geeigneten Enzym wurde ein Gemisch unterschiedlich verkürzter Fragmente erzeugt, die in einem Agarose-Gel aufgetrennt wurden. Aus diesem Gel wurden die Fragmente des gewünschten Längenbereiches ausgeschnitten und kloniert.

2x Bal 31-Verdauungspuffer:

40 mM Tris/HCl pH 7,9
120 mM NaCl
25 mM MgCl₂
25 mM CaCl₂
2 mM EDTA

3.5.6. Ligation:

Die Ligation erfolgte in einem Endvolumen von 20 bis 30 µl bei 16°C über Nacht (94). Die Bedingungen der Ligation waren wie folgt:

66 mM Tris/HCl pH 7,4
5 mM MgCl₂
10 mM DTT
1 mM ATP
50 ng Vektor-DNA
100 ng "insert"-DNA
1 U T₄-DNA-Ligase (bei stumpfen DNA Enden 1,5 U)

Die Ligationsansätze wurden bis zur Transformation der Bakterien bei -20°C aufbewahrt.

3.5.7. Transformation von Bakterien (94):

3.5.7.1. Transformation mit Plasmid-DNA:

Zur Transformation wurden kompetente Bakterien der E.coli-Stämme JM 101/103/109/111 (96) und C 600 (97) eingesetzt.

Die Transformation erfolgte mit einem Aliquot der Ligationsansätze, wobei 10 bis 200 ng DNA pro Transformation eingesetzt wurden. Zu 200 µl kompetenten Bakterien, die langsam im Eisbad aufgetaut wurden, wurde die entsprechende Menge an Ligationsansatz zugefügt und diese Suspension für 30 bis 60 min im Eisbad inkubiert. Nach einem Hitzeschritt (42°C, 90 sec) erfolgte dann die Zugabe von 700 µl Medium (LB- oder NZ-Medium) und eine Inkubation des Ansatzes bei 37°C für 30 min. Nun wurden pro Ansatz 150 bis 300 µl der Suspension auf Selektionsplatten (LB- bzw. NZ-Amp-Platten) ausplattiert. Daran schloß sich die Inkubation der Platten für 8 bis 16 Stunden bei 37°C im Brutschrank an. Nach dieser Zeit waren auf den Platten die Bakterienkolonien deutlich sichtbar.

LB-Medium:

pro l Medium: 10 g NaCl, 10 g Casein-Hydrolysat, 5 g Hefe-Extrakt, pH mit NaOH auf pH 7 einstellen, 15 bis 30 min autoklavieren

NZ-Medium:

pro l Medium: 16 g "NZ-Broth", 5g NaCl, 5g Hefe-Extrakt pH mit NaOH auf pH 7 einstellen 15 bis 30 min autoklavieren

LB/NZ-Amp-Platten:

100 ml LB- bzw. NZ-Medium wurden mit 1,5 g Bacto-Agar 15 bis 30 min autoklaviert und dann bis auf 45°C abgekühlt. Nach Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml Endkonzentration) wurden 10 ml dieser Lösung in sterile Plastikplatten gegossen. Nach dem Erstarren bei RT waren die Platten bei 0 bis 4°C zu lagern und etwa 4 bis 6 Wochen zu gebrauchen.

3.5.7.2. Transformation mit M13-Derivaten:

Bei der Klonierung von DNA-Fragmenten im M13mp18-Vektor erfolgten die meisten Schritte analog zu denen bei Klonierungen in Plasmid-Vektoren, da sich die doppelsträngige Form des Vektors (die RF-Form) wie ein Plasmid behandeln läßt.

Die Transformation von kompetenten Bakterien (JM 101) mit M13mp18-Derivaten erfolgte nach einer etwas anderen Methode als in 3.5.7.1. beschrieben.

Nach der Inkubation der kompetenten Bakterien mit Aliquots der Ligationsansätze (siehe 3.5.7.1.) wurde der Ansatz mit 100 µl einer Ü-Kultur von JM 101 versetzt und auf NZ-Platten aufgegeben. Dann wurden 4 bis 8 ml NZ-Topagar auf die Platte aufgetragen und durch Umschütteln auf der Platte verteilt.

Nach Erstarren des Topagars wurden die Platten 12 bis 16 h bei 37°C im Warmluftinkubator inkubiert. Dann waren innerhalb des ausgebildeten Bakterienrasens die durch M13-Phagen erzeugten Plaques sichtbar.

NZ-Topagar:

pro 100 ml NZ-Medium 1,25 g Bacto-Agar, autoklavieren und vor dem Ausplattieren auf 45°C abkühlen lassen

3.5.8. Herstellung kompetenter Bakterien (94):

Zunächst wurden 500 ml LB-Medium (bzw. NZ-Medium) mit 5 ml einer Ü-Kultur des gewünschten Bakterienstammes angeimpft und so lange bei 37°C inkubiert (Warmluftschüttler), bis die OD der Suspension bei 600 nm einen Wert von ca. 0,2 bis 0,5 ergab.

Die weiteren Schritte erfolgten dann bei 0 bis 4°C.

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation im GSA-Rotor für 15 min (6000 rpm, 5900x g) geerntet und in 250 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach 20 min im Eisbad wurde die Suspension im GSA-Rotor (3000 rpm, 1500x g, 15 min) zentrifugiert und das Sediment in 5 bis 10 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen. Nach Zugabe von sterilem Glycerin (Endkonzentration 20 %) erfolgte die Aliquotierung der Suspension zu 200 µl in sterilen Eppendorfgefäßen. Die Suspension wurde dann auf flüssigem N₂ schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3.6. DNA-Präparationen:

3.6.1. Plasmid-Präparationen:

3.6.1.1. Plasmid-Präparation im kleinen Maßstab:

Zur Analyse der nach Klonierung erhaltenen Subklone wurde eine Plasmid-DNA-Präparation im kleinen Maßstab durchgeführt (98).

Dabei wurden 5 ml Medium (LB oder NZ, mit 100 µg/ml Ampicillin) mit Bakterienmaterial von einer Selektionsplatte angeimpft und dann bei 37°C über Nacht (mindestens 6 h) im Warmluftschüttler inkubiert. 1,5 ml dieser Kultur wurden dann in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und die Bakterien durch Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge geerntet. Die

Bakterien wurden gut in 100 µl Lösung 1 (mit 8 mg/ml Lysozym) resuspendiert und dann 200 µl Lösung 2 zugegeben. Die Suspension wurde gut durchmischt und 5 min im Eisbad inkubiert, worauf 150 µl Lösung 3 zugegeben wurden. Nach Vermischen und Inkubation auf Eis für 5 min wurden die Ansätze erneut zentrifugiert (15 min, 9000 rpm, RT). Der Überstand wurde mit 400 µl Phenol-Lösung und 400 µl Chloroformlösung extrahiert. Nach Zentrifugation (5 min, 9000 rpm, RT) wurden 400 µl der wässrigen Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml Ethanol versetzt. Die Fällung verblieb 2 min bei RT, wurde dann durch Zentrifugation gesammelt (RT, 15 min, 9000 rpm), gewaschen und getrocknet. Die Nukleinsäuren wurden in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. 5 µl dieser Lösung enthielten genug DNA für eine Restriktionsanalyse zur Überprüfung der Klonierung. Dazu war zumeist eine RNase A-Verdauung vor der Gelelektrophorese erforderlich (1 µl 10mg/ml RNase A pro Ansatz), um die RNA zu entfernen.

Sollte die RF-Form bei Klonierungen in M13mp18 im kleinen Maßstab isoliert werden, mußten 5 ml NZ-Medium mit 100 µl einer Ü-Kultur von E.Coli JM 101 und etwas Plaque-Material des zu untersuchenden M13mp18-Klones angeimpft werden.

Lösung 1:

50 mM Glukose

25 mM Tris/HCl pH 8

10 mM EDTA

Lösung 2:

0,2 N NaOH

1 % SDS

Lösung 3:

3 M KAc pH 5,5

3.6.1.2. Plasmid-Präparation im großen Maßstab (94):

DNA ausgewählter Subklone wurde präparativ isoliert. Dazu wurden 500 ml LB-Medium (bzw. NZ), die 100 µg pro ml Ampicillin enthielten, mit 1 ml einer Ü-Kultur des Bakterienklones angeimpft und über Nacht bei 37°C im Warmluftschüttler inkubiert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte dann analog der in 3.6.1.1. beschriebenen Methode mit vergrößertem Volumen. Die so isolierte Plasmid-DNA wurde dann durch eine CsCl-Gleichgewichtszentrifugation von der RNA und der bakteriellen, chromosomalen DNA gereinigt. Durch dieses Verfahren wurde zum überwiegenden Teil die superhelikale Form der Plasmide isoliert.

3.6.2. Präparation von Einzelstrang DNA im kleinen Maßstab:

Sowohl für die Methode der gerichteten Mutagenese mit Oligonukleotiden als auch bei der Sequenzierung nach der Methode von Sanger wurde einzelsträngige DNA benötigt.

3.6.2.1. Präparation von einzelsträngiger DNA bei M13mp18-Derivaten (94):

6 ml NZ-Medium wurden mit 100 µl einer Ü-Kultur von E.Coli JM 101 und Plaque-Material des M13mp18-Klones, aus dem der Einzelstrang zu präparieren war, angeimpft. Der Ansatz wurde mindestens 6 h bei 37°C im Warmluftschüttler inkubiert und dann 4 mal je 1,5 ml der Kultur in Eppendorfgläser überführt. Nach Zentrifugation in der Eppendorfschüttelfuge (RT, 9000 rpm, 10000x g, 5 min) wurde der Überstand noch einmal 5 min zentrifugiert. 1,3 ml des Überstandes wurden mit 150 µl PEG-Lösung versetzt. Nach mindestens 30 min im Eisbad erfolgte eine Zentrifugation des Ansatzes (RT, 9000 rpm, 10000x g, 15 min). Jedes Sediment wurde in 50 µl TES resuspendiert und die 4 Ansätze wieder vereinigt. Die Ansätze wurden mit 200 µl Phenol-Lösung versetzt und gut auf dem Vortex-Mixer vermischt (30 sec Mischen, 5 min Pause, 30 sec Mischen). Nach Zentrifugation (9000 rpm, 10000x g, 5 min, RT) wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und noch einmal mit 200 µl Phenol-Lösung und mit 200 µl Chloroform-Lösung extrahiert. Die Einzelstrang-DNA konnte nach Zugabe von 0,3 M NaAc (Endkonzentration) und 2,5 Volumen Ethanol gefällt werden. Nach mindestens 2 h bei -20°C wurde der Ansatz zentrifugiert (9000 rpm, 10000x g, 15 min, RT) und nach Waschen und Trocknen die einzelsträngige DNA in 10 µl TE-Puffer aufgenommen.

TES: TE-Puffer mit 10 mM NaCl

3.6.2.2. Präparation von Einzelstrang-DNA bei pBluescript-Derivaten:

Bei Klonierung von DNA-Fragmenten in das pBluescript-Vektorsystem bietet sich die Möglichkeit, durch Zugabe eines Helferphagen (F1 oder M13, 99) einzelsträngige DNA zu isolieren. Dieser Vektor enthält neben dem "origin" (Ursprungspunkt der Replikation) aus dem Plasmid Col E1, der die Replikation des doppelsträngigen Plasmidmoleküls in E.coli-Zellen ermöglicht, auch den "origin" des Einzelstrangphagen F1. Daher wird nach Supplementation mit den notwendigen Enzymen des Helferphagen auch von dem pBluescript-Derivat einzelsträngige DNA gebildet.

Zur Präparation von Einzelstrang-DNA aus pBluescript-Derivaten mußte der zu analysierende Plasmid-Klon im Wirt E.coli JM 101 vorliegen. 6 ml NZ-Medium, die 100 µg/ml Ampicillin enthielten, wurden entweder mit Bakterienmaterial von einer Selektionsplatte (NZ-Amp) oder 100 µl einer Bakterienkultur angeimpft. Nach 2 bis 3 Stunden im Warmluftschüttler bei 37°C wurden der Kultur 4 bis 5 µl einer Suspension zugefügt, die 10^{10} bis 10^{11} Helferphagen pro ml enthielt. Dieser Ansatz wurde mindestens 6

h im Warmluftschüttler bei 37°C inkubiert und dann analog zu der in 3.6.2.1. beschriebenen Methode aufgearbeitet.

3.7. Endmarkierung von DNA:

3.7.1. 5'-Endmarkierung von DNA:

Für die S₁-Kartierung mit radioaktiv markierter DNA waren DNA-Fragmente zu verwenden, die am 5'-Ende eine ³²P-Phosphatgruppe trugen. Auch für die meisten DNA-Sequenzierungen nach Maxam und Gilbert wurden 5'-endmarkierte DNA-Fragmente verwandt (100).

Dazu wurde die DNA so restringiert, daß Moleküle mit 5'-überhängenden oder stumpfen Enden entstanden. Dann wurde das 5'-Phosphat durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase aus Rinderdarm entfernt (3.5.2.). Nach Phenolextraktion und Reinigung wurde die in H₂O gelöste DNA in einem Agarose-Gel aufgetrennt und die gewünschten Fragmente, wie unter 3.8.1.2. beschrieben, isoliert.

Die dephosphorylierte DNA wurde dann durch Inkubation mit Polynukleotid-Kinase in Anwesenheit von γ -³²P-ATP endmarkiert, wobei folgender Ansatz für meist 16 h bei 37°C inkubiert wurde :

0,5 bis 1 µg DNA
 2 µl Kinase-Puffer
 1 µl Polynukleotidkinase (7 U/µl)
 40 µCi γ -³²P-ATP (6000 Ci/mmol)
 ad 20 µl mit H₂O

Die so markierte DNA wurde entweder nach einer weiteren Restriktion durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt (bei Fragmenten zur Sequenzierung) oder direkt nach zweimaligem Umfällen aus 2,5 M NH₄Ac, zur Abtrennung des nicht eingebauten γ -³²P-ATP, eingesetzt.

Kinase-Puffer:

500 mM Tris/HCl pH 7,6
 100 mM MgCl₂
 50 mM DTT
 1 mM Spermidin
 1 mM EDTA

3.7.2. 3'-Endmarkierung:

Die radioaktive Markierung der 3'-Enden von DNA erfolgte durch die Auffüllreaktion mit Hilfe des Klenows-Enzyms, wie in 3.5.3. beschrieben, jedoch in Gegenwart eines radioaktiv markierten Nukleotids.

Ein typischer Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

0,5 bis 1 µg	restringierte DNA
2 µl	10x "core"-Puffer
4 µl	2 mM dGTP, dCTP, dTTP
1 µl	Klenow-Enzym (5 Einheiten / µl)
40 µCi	α - ³² P-dATP (3000 Ci/mmol)
ad	20 µl mit H ₂ O

Die so markierten DNA-Fragmente wurden dann entweder durch zweimaliges Umfällen aus 2,5 M NH₄Ac gereinigt oder nach Agarose-Gelelektrophorese mit Hilfe der NA 45-Membran (siehe 3.8.1.2.) zurückgewonnen.

3.8. Gelelektrophorese:

3.8.1.1. Agarose-Gelelektrophorese:

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von DNA-Molekülen angewendet. Sie erfolgte in horizontalen Agarosegelen (0,8 - 2 % Agarose) mit 1x TEB-Puffer als Elektrophorese-Puffer und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Die Proben wurden vor der Elektrophorese mit 1/5 Volumen an DNA-Probenpuffer versetzt. Nach der Elektrophorese konnten die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

1x TEB-Puffer:

1,08 %	Tris	pH 8,3
0,55 %	Borsäure	
20 mM	EDTA	

DNA-Probenpuffer:

10 mM	EDTA
25 %	Ficoll (400)
0,125 %	Bromphenolblau
0,125 %	Xylen-Cyanol

3.8.1.2 Rückgewinnung von DNA-Molekülen aus Agarose-Gelen:

Nach Lokalisation der gewünschten DNA-Bande mit Hilfe von langwelligem UV-Licht wurde in der Nähe der Bande ein Agaroseblock ausgeschnitten. An die Kante des entstehenden Spaltes wurde ein passendes Stück NA-45 Membran (101,102) gelegt und durch Wiedereinfügen des Agaroseblocks festgepreßt. Die DNA wurde auf die Membran aufelektrophoretisiert und die Membran entnommen. Nach Waschen der Membran in L-NET-Puffer

wurde die DNA durch zweimalige Inkubation der Membran bei 50 bis 65°C mit 200 µl H-NET-Puffer für 10 bis 45 min eluiert. Nach Vereinigung der beiden Eluate wurde die DNA durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol ausgefällt (-70°C, 15 min). Die in 100 µl 0,3 M NaAc gelöste DNA wurde mit Phenol/Chloroform-Lösung und mit wassergesättigtem 1-Butanol extrahiert. Nach Fällung wurde die DNA in TE-Puffer gelöst.

L-NET-Puffer:

20 mM Tris/HCl pH 8
0,1 mM EDTA
150 mM NaCl

H-NET-Puffer:

20 mM Tris/HCl pH 8
0,1 mM EDTA
1 M NaCl

3.8.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Zur Analyse von niedermolekularen radioaktiv markierten RNA- und DNA-Molekülen wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit denaturierenden Harnstoffgelen durchgeführt.

Native Polyacrylamidgele wurden für die Analyse sehr kleiner DNA-Fragmente eingesetzt.

3.8.2.1. Native Polyacrylamidgele:

Bei Analyse von DNA-Fragmenten, die kleiner als 100 bp waren oder wenn DNA-Fragmente mit geringem Größenunterschied voneinander zu trennen waren, erfolgte die Analyse mit Hilfe nativer Polyacrylamidgele mit 5 % Polyacrylamid. Der Laufpuffer der Elektrophorese war wiederum 1x TEB-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid.

Gel-Lösung:

10 ml 30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid
6 ml 10x TEB
mit H₂O ad 60 ml
150 µl 10 % Ammoniumpersulfat
70 µl TEMED (konz.)

3.8.2.2. Denaturierende Harnstoffgele:

RNA- bzw. DNA-Elektrophoresen unter denaturierenden Bedingungen wurden mit 4-8 %igen Polyacrylamidgelen in Gegenwart von 8 M Harnstoff und 1x TEB als Elektrophorese-Puffer durchgeführt. Dazu wurden die gereinigten DNA- oder RNA-Proben in H₂O aufgenommen und dann mit 3 Volumen FA-Puffer versetzt. Nach 5 min bei 95°C (Denaturierung) wurden die Proben dann auf das Gel aufgetragen. Die Dauer der Elektrophorese rich-

tete sich nach der Länge der zu analysierenden DNA- bzw. RNA-Moleküle und erfolgte zumeist bei konstant 35 mA.

FA-Puffer:

- 1x TEB
- 0,125 % Bromphenolblau
- 0,125 % Xylen-Cyanol
- 90 % Formamid (2x umkristallisiert)

Gel-Lösungen:

Acrylamid-

Konzentrationen :	4 %	5 %	6 %	8 %
-------------------	-----	-----	-----	-----

40 % Acrylamid/

2% Bisacrylamid :	4 ml	6,25 ml	7,5ml	10 ml
-------------------	------	---------	-------	-------

10x TEB :		5 ml		
-----------	--	------	--	--

Harnstoff :		24 g		
-------------	--	------	--	--

H ₂ O :		ad 50 ml		
--------------------	--	----------	--	--

10 % Ammonium-

persulfat :		150 µl		
-------------	--	--------	--	--

TEMED (konz.) :		75 µl		
-----------------	--	-------	--	--

Vor Zugabe des Ammoniumpersulfats und des TEMEDs wurde die Gellösung im Wasserstrahlpumpen-Vakuum entgast.

Sowohl die Dicke der Gele (0,2 bis 1,5 mm) als auch ihre Länge variierte je nach dem vorhandenen Trennproblem und der zu erwartenden Menge an Nukleinsäuren in der Probe.

Als Größen-Marker wurden bei allen Polyacrylamid-Gelelektrophoresen in denaturierenden Harnstoffgelen die Produkte der Restriktion des Plasmids pYH48 (103) mit dem Restriktionsenzym Alu I eingesetzt. Dazu wurden die Fragmente mit Hilfe der Polynukleotidkinase, wie in 3.7.1. beschrieben, am 5'-Ende radioaktiv markiert.

3.9. Autoradiographie/Bestimmung der radioaktiven Aktivität:

3.9.1. Autoradioographie:

Zur Lokalisation der radioaktiv markierten Nukleinsäuren nach Gelelektrophorese in denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoffgelen wurden die Gele zumeist erst getrocknet und dann ein Röntgenfilm (Fuji RX) aufgelegt. Die

Exposition erfolgte zumeist in einer Kasette bei -70°C mit einer Cronex-Verstärker-Folie (DuPont) mit nachfolgender Entwicklung gemäß den Angaben des Herstellers.

3.9.2. Bestimmung der radioaktiven Aktivität ausgeschnittener Gelbanden:

Nach Lokalisation radioaktiv markierter Nukleinsäuren durch die Autoradiographie wurden Banden aus dem getrockneten Gel ausgeschnitten und in Scintillationsmeßgefäße mit Quick-Scint 2000 (Zinser Analytic) als Scintillator überführt. Die Zahl der radioaktiven Zerfälle wurde dann in einem Searle Delta 300-"Counter" im ^{32}P -Kanal bestimmt, wobei jede Probe dreimal für 20 min gezählt wurde, um statistische Schwankungen auszugleichen.

3.10. DNA-Sequenzierungen:

Die Sequenzierung von DNA wurde entweder nach der Methode von Maxam und Gilbert (100) oder nach der von Sanger (104) durchgeführt.

3.10.1. DNA-Sequenzierung nach Maxam und Gilbert:

Für die DNA-Sequenzierung nach Maxam und Gilbert wurden zumeist DNA-Fragmente eingesetzt, die am 5'-Ende markiert waren (siehe 3.7.1.). Die Sequenzierung wurde mit dem Sequenzierungs-"Kit" der Firma Merck durchgeführt, wobei genau die angegebene Vorschrift befolgt, jedoch nur 1 μg unspezifische DNA pro Sequenzierungsreaktion eingesetzt wurde.

3.10.2. DNA-Sequenzierung nach Sanger:

Die DNA-Sequenzierung nach der Methode von Sanger wurde mit dem T7-DNA-Polymerase-"Kit" von Pharmacia nach Vorschrift unter Einsatz von ^{35}S -dATP durchgeführt. Als Matrize der Sequenzier-Reaktion gelangte sowohl einzelsträngige DNA (M13mp18- und pBluescript-Derivate) als auch doppelsträngige Plasmid-DNA zum Einsatz. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte in der LKB-Makrophor-Apparatur, wobei 4 % Polyacrylamid/8 M Harnstoff-Gele benutzt wurden, die einen Dicke-Gradienten von 0,2 zu 0,4 mm aufwiesen. Die Autoradiographie der getrockneten Gele erfolgte bei RT.

3.11. Ortsspezifische Mutagenese mit synthetischen Oligonukleotiden:

Zum spezifischen Austausch von Nukleotiden in der DNA wurde die Methode der Oligonukleotid-gesteuerten Mutagenese durchgeführt. Hierfür wurde der Mutagenese-"Kit" der Firma Amersham verwandt.

Bei diesem Verfahren wird mit einem modifizierten Oligonukleotid als "primer" an einem die zu mutagenisierende DNA enthaltenen Einzelstrang unter Einsatz von α -S-dCTP und Klenow-Enzym in-vitro ein DNA-Doppelstrang synthetisiert. Nach Schließen der letzten Lücke des neu gebildeten Stranges durch die T₄-DNA-Ligase wird der restliche Einzelstrang abfiltriert. Der Doppelstrang wird mit der Restriktionsendonuklease Nci I verdaut. Dieses Enzym schneidet nur in dem DNA-Strang, der keinen Schwefel enthält. Daher kommt es zu Einzelstrangbrüchen in dem nicht mutagenisierten DNA-Strang. Mit Hilfe der Exonuklease III wird der nicht mutagenisierte Strang partiell abgebaut und durch DNA-Polymerase I aus E.coli vollständig neu synthetisiert. So wird ein doppelsträngiges DNA-Molekül gebildet, das in beiden Strängen die Mutation enthält. Nach Transformation der so erzeugten DNA in E.coli JM 101 erhält man mit etwa 80 % Ausbeute Konstrukte mit der gewünschten Mutation.

Die verwandten Oligonukleotide wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Winfried Krüger zur Verfügung gestellt.

3.12. "Dot-Blot"-Hybridisierungen:

Neben der Methode der S₁-Verdauungsschutzanalyse wurde zur Überprüfung der Spezifität von Transkripten auch die Methode der "Dot-Blot"-Hybridisierung angewandt. Dabei wurden 1 bis 2 μ g eines spezifischen DNA-Fragments auf Nylon-Filter mit 1 cm² Fläche aufgebracht. Nach Trocknen der Nylon-Filter wurden diese mit der Seite, auf die die DNA aufgetragen wurde, nach oben auf Filterpapier gelegt, das mit Denaturierungs-Lösung getränkt war. Nach 10 min bei RT gelangten die Nylon-Filter auf Filterpapier, das mit Neutralisierungs-Lösung getränkt war. Nach weiteren 10 min bei RT wurden die Filter erst an der Luft und dann im Vakuumofen bei 80°C 1 h getrocknet.

Die so vorbehandelten Filter wurden mindestens 4 h bei 45°C in 300 μ l Vorhybridisierungs-Lösung inkubiert. Danach erfolgte die Hybridisierung der Nylon-Filter mit den in-vitro synthetisierten, radioaktiv markierten RNAs bei 45°C für mindestens 48 h. Nach Abnehmen der Hybridisierungs-Lösung wurden die Filter zuerst zweimal 5 min bei RT mit 1x SSC/0,1 % SDS und dann zweimal mit 0,2x SSC /0,1 % SDS bei 45°C für je 45 min gewaschen. Anschließend wurde den gewaschenen Filtern 100 μ l TE/SDS mit 10 μ g tRNA zugegeben und der Ansatz für 5 min auf 100°C erhitzt, um die hybridisierte RNA abzuschmelzen. Die Lösung wurde nach dem Erhitzen sofort abgenommen und, zur Ausfällung der RNA, 1/10 Volumen 3 M NaAc und 2,5 Volumen Ethanol zugesetzt. Nach Zentrifugation (15 min, 9000 rpm, 10000x g, RT), Waschen und Trocknen konnte die RNA in 3 μ l hoch-

reinem H₂O aufgenommen und nach Zugabe von 12 µl FA-Puffer in einem Polyacrylamid-Harnstoffgel analysiert werden.

Denaturierungslösung:

0,5 N NaOH

1,5 M NaCl

Neutralisierungslösung:

3 M NaAc pH 5,5

Vorhybridisierungslösung:

5x SSC (1x : 0,15 M NaCl; 0,015 M Na-Citrat; pH 7,5)

5x Denhardts (1x : 0,02 % an BSA, PVP und Ficoll 400)

0,1 % SDS

50 mM NaH₂PO₄

0,25 mg/ml E.coli-Nukleinsäuren (denaturiert)

50 % Formamid (entionisiert, 2x umkristallisiert)

Hybridisierungslösung:

wie Vorhybridisierungslösung, jedoch mit denaturierter radioaktiver RNA

TE/SDS:

10 mM Tris/HCl pH 7,9, 1 mM EDTA, 0,5 % SDS

4. Ergebnisse

4.1. Einfluß verschiedener DNA-Sequenzen auf die in-vitro Transkription des menschlichen 7S K RNA Gens

Wie in der Einleitung beschrieben, hatte W. Krüger im Rahmen seiner Dissertation aus einer menschlichen Genbank ein funktionelles 7S K RNA Gen isoliert (69,71,72). Dieses Gen lag als Subklon p7SK/DE vor, dessen Struktur in Abbildung 1 gezeigt ist.

Weiterhin hatte W. Krüger gezeigt, daß die 5'-flankierende Sequenz des 7S K Gens bis zur Position -67 für dessen in-vitro Expression notwendig ist (69,71,72).

Es sollten nun die weiteren Sequenz-Bereiche des 7S K Gens analysiert werden, die für die in-vitro Transkription des Gens notwendig sind. Es war die Frage zu klären, ob das 7S K RNA Gen geninterne Promotor-Sequenzen aufweist. Die Analyse sollte zeigen, ob entweder ein "split"-Promotor mit "A-Box" und "B-Box", wie bei den tRNA Genen, oder ein zusammenhängender interner Sequenz Bereich, wie der ICR des 5S rRNA Gens, beim 7S K Gen die Expression steuert.

4.1.1. In-vitro Transkription mit 7S K-Deletionsmutanten

Das 7S K Gen zeigt sowohl eine "A-Box"- (+9 bis +18) als auch eine "B-Box"-Homologie (+49 bis +58; 21,50,51,71). Da die Konsensus-Sequenzen für diese Homologien jedoch relativ viele divergente Basen zulassen ("A-Box" : TRGCNNAGY_GG; "B-Box" : GGTTTCGANTCC), ist über den Sequenzvergleich die Identifizierung eines vermuteten geninternen Promotor-Elements im 7S K Gen nicht möglich. Zur Analyse der zur in-vitro Transkription essentiellen internen Promotorsequenzen wurden verschiedene Deletionen in die kodierende Sequenz des 7S K Gens eingeführt, wobei die verschiedenen Schnittstellen für Restriktionsenzyme ausgenutzt wurden.

So entstand der Deletionsklon p7SK dAv/Av durch Religation des Pst I-Ava II und des Ava II-Eco RI-Fragments aus p7SK/DE in pUC8, restrinkt mit Pst I und Eco RI. Alle anderen Deletionsklone wurden analog erzeugt, und es entstanden Konstrukte mit folgenden Deletionen (siehe Abbildung 1):

p7SK dAv/Av	Deletion von +169 bis +239 (Ava II-Ava II)
p7SK dS1/S3	Deletion von +12 bis +63 (Sau 3A1-Sau 3A3)
p7SK dT/Ac	Deletion von +139 bis +189 (Taq I-Acc I)
p7SK dHf/Hf	Deletion von +55 bis +279 (Hinf I-Hinf I)

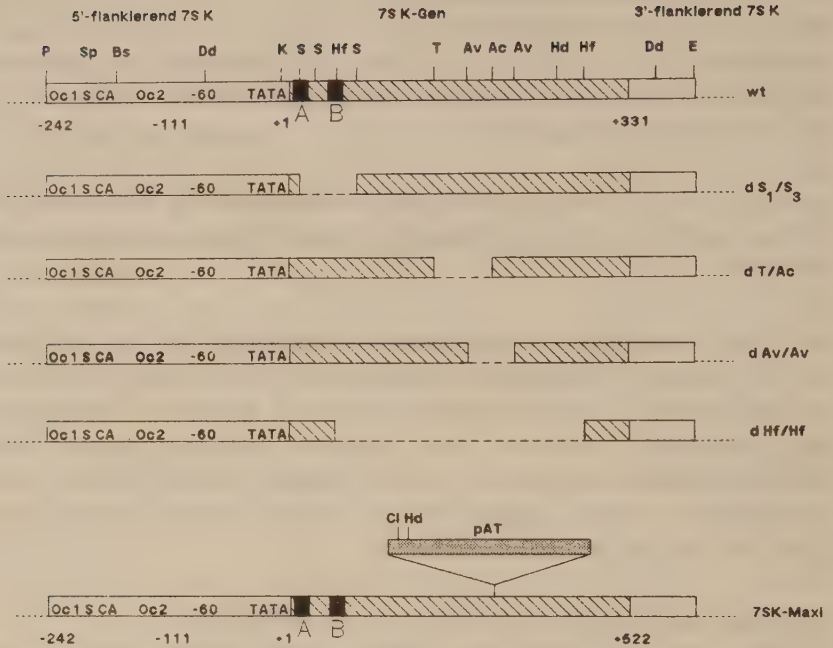


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Konstrukte p7SK/DE, p7SK/DE-Maxi und der Subklone mit internen Deletionen im 7S K Gen

A = A-Box-Homologie; B = B-Box-Homologie
 Oc = Oktamer-Homologie (1 = distal, 2 = proximal)
 Ca = "CACCC"-Box-Homologie, TATA = "TATA"-Box
 -60 = PSE-Sequenz, S = Sph-Box-Homologie

Schnittstellen von Restriktionsenzymen:

Ac = Acc I; Av = Ava II; Bs = Bsm I; Cl = Cla I; Dd = Dde I;
 E = Eco RI; Hd = Hind III; Hf = Hinf I; K = Kpn I;
 P = Pst I; S = Sau 3A; Sp = Sph I; T = Taq I

Bei inkompatiblen DNA-Enden wurden diese durch Behandlung mit Klenow-Enzym aufgefüllt.

Da bei der Erstellung des Subklones p7SK dS₁/S₃ zwar die "B-Box"-Homologie entfernt worden war, jedoch wieder eine "A-Box"-Homologie durch

diese Fusion rekonstituiert wurde, mußte eine zweite "Sau 3A-Deletionsmutante" hergestellt werden, bei der die 5'-überhängenden Sau 3A-Enden durch die Mung Bohnen Nuklease abgedaut wurden, so daß nach Religation keine "A-Box" mehr entstehen konnte (der Subklon p7SK dS₁/S₃MB). Das 7S K Maxigen entstand durch Integration des Eco RI-Eco RV-Fragmentes aus pAT153 (Eco RI-Ende aufgefüllt) in die aufgefüllte Acc I-Schnittstelle des Konstrukts p7SK/DE.

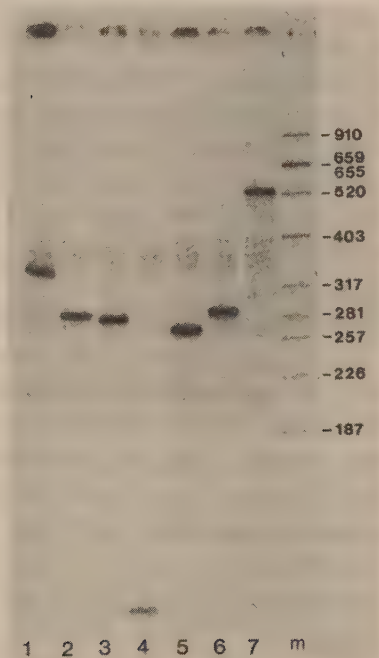


Abbildung 2:

Autoradiogramm der gelelektrophoretischen Analyse der Produkte der in-vitro Transkription mit S100-Extrakt und den folgenden Konstrukten als Matrize der Transkription :

1. p7SK/DE
2. p7SK dS₁/S₃
3. p7SK dS₁/S₃MB
4. p7SK dHf/Hf
5. p7SK dAv/Av
6. p7SK dT/Ac
7. p7SK/DE-Maxi

m. Marker pYH48 restringiert mit Alu I

Abbildung 2 zeigt die Produkte der in-vitro Transkription mit cytoplasmatischen S100-Extrakt und den Deletionsklonen als Matrize. Alle Deletionsklone (Spur 2 bis 6) ergaben die erwarteten spezifischen Transkripte (dS₁/S₃ : 279 nt; dS₁/S₃MB : 274 nt; dHf/Hf : 107 nt; dAv/Av : 262 nt; dT/Ac : 283 nt) und wurden mit der gleichen Effektivität wie der Wildtyp-Klon (Spur 1) exprimiert. Selbst beim Deletionsklon p7SK dHf/Hf, der nur noch 107 bp 7S K Gensequenz enthielt, trat keine Minderung der Tran-

skriptionsrate auf. Die beobachtete Abnahme der Bandenintensität ist durch die starke Verkürzung des Transkripts im Vergleich zum Wildtypgen zu erklären. Auch das Maxigen (Spur 8, 522 nt Transkript) wurde korrekt und effektiv transkribiert. Die Spezifität der Transkripte wurde durch Hybridselektion überprüft, wobei das Pst I-Eco RI-Fragment aus p7SK/DE mit den radioaktiv markierten RNAs der in-vitro Transkription hybridisiert wurde (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß die geninterne Sequenz des 7S K RNA Gens für die in-vitro Transkription nicht benötigt wird.

4.1.2. In-vitro Transkription der 7S K-pAT153-Fusionskonstrukte

Die oben gezeigten Daten legten die Annahme nahe, daß das 7S K Gen einen rein genexternen, im 5'-flankierenden Sequenzbereich liegenden Promotor aufweist, ähnlich wie es in parallelen Untersuchungen beim Us snRNA Gen verschiedener Spezies gezeigt worden ist (21,22,28,54 - 57).

Zur Bestätigung dieser Annahme wurden 7S K-pAT-Konstrukte erzeugt, bei denen die 5'-flankierende Sequenz des 7S K Gens (-242 bis -2) direkt vor eine prokaryote Vektor-Sequenz kloniert wurde. Die Abbildung 3 zeigt schematisch die Struktur der erzeugten Subklone.

Dazu wurde das Pst I-Kpn I-Fragment (-242 bis -2) aus p7SK/DE in den Vektor pUC18 (restringiert mit Pst I und Kpn I) kloniert. Aus diesem Zwischenklon wurde das 5'-flankierende 7S K Fragment als Pst I-Eco RI-Fragment wieder isoliert und in pAT153, restringiert mit Pst I und Eco RI, eingefügt (pAT 5'7SK, 105). Da pAT 5'7SK zwar die 5'-flankierende DNA-Sequenz (den putativen Promotor), jedoch kein Terminationssignal der Pol III-Transkription enthielt, wurde im nächsten Schritt das Pst I-Eco RV-Fragment aus pAT 5'7SK (5'-flankierend + 196 bp Vektorsequenz) zusammen mit dem Hinf I-Eco RI-Fragment aus p7SK/DE (91 bp, Hinf I-Ende mit Klenow aufgefüllt, Terminationssignal) in einen pUC8-Vektor kloniert, der mit Pst I und Eco RI restringiert worden war. Bei dem so entstandenen Subklon p7SK5'+3' sind somit die ersten 279 bp des 7S K Gens durch 196 bp prokaryote Vektor-Sequenz ersetzt.

Durch Klonierung des Pst I-Eco RV-Fragments aus pAT 5'7SK in den Subklon p7SK5'+3', restringiert mit Pst I und Cla I (Schnittstelle aufgefüllt), entstand dann das Konstrukt p7SK5'+3'Maxi.

Die Abbildung 4A zeigt die Produkte der in-vitro Transkription mit S100-Extrakt und den Konstrukten p7SK5'+3'(Spur 2) und p7SK5'+3'Maxi (Spur 3) im Vergleich zum Wildtyp (Spur 1). Bei beiden Konstrukten sind die spezifischen Transkripte (p7SK5'+3' : 246 nt, p7SK5'+3'Maxi: 409 nt) zu er-

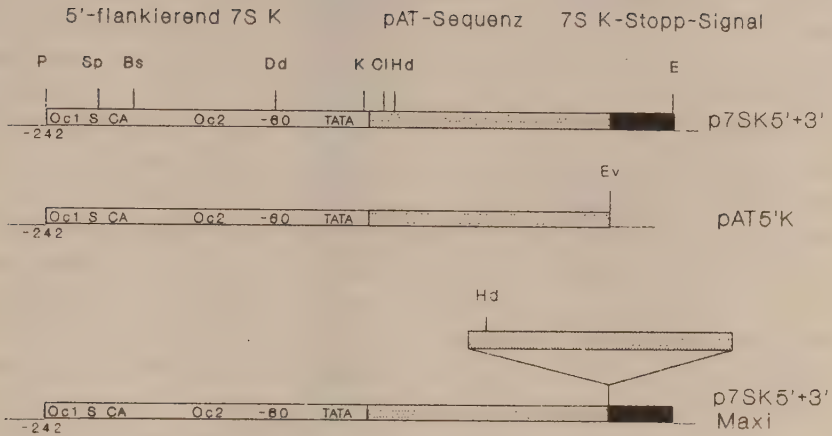


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Konstrukte pAT 5'7SK, p7SK5'+3' und p7SK5'+3'Maxi

Oc = Oktamer-Homologie (1 = distal, 2 = proximal)

CA = "CACCC"-Box-Homologie, TATA = "TATA"-Box

-60 = PSE-Sequenz, S = Sph-Box-Homologie

Schnittstellen für Restriktionsenzyme:

Bs = Bsm I; Cl = Cla I; Dd = Dde I; E = Eco RI; Ev = Eco RV;
Hd = Hind III; K = Kpn I; P = Pst I; Sp = Sph I

kennen. Die Effektivität der Transkription ist mit der des Wildtyps zu vergleichen, wenn auch eine leichte Reduzierung zu erkennen ist.

Zur Feststellung der Spezifität der Transkripte wie zur genauen Bestimmung des Startpunktes der Transkription wurde mit den Produkten der in-vitro Transkription mit den Konstrukten p7SK5'+3', p7SK5'+3'Maxi und pAT 5'7SK als Matrize eine S₁-Analyse durchgeführt. Dabei wurden die erzeugten Transkripte mit dem Pst I-Eco RV-Fragment aus pAT 5'7SK, das mit γ -³²P-ATP und Polynukleotidkinase an der Eco RV-Schnittstelle radioaktiv markiert worden war, hybridisiert und anschließend die Hybride mit S₁-Nuklease verdaut. Abbildung 4B zeigt die Analyse der geschützten

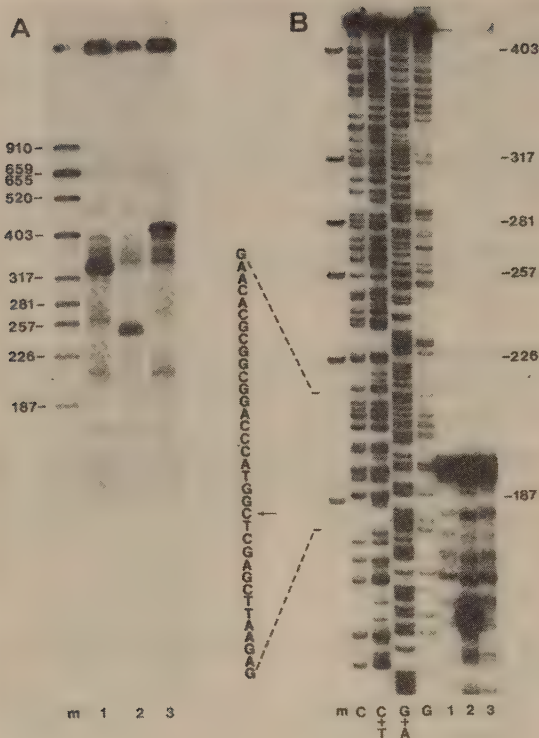


Abbildung 4A: Gelelektrophoretische Analyse der Produkte der *in-vitro* Transkription mit S100 Extrakt und den folgenden Konstrukten als Matrize der Reaktion:

1. p7SK/DE Wildtyp
2. p7SK5'+3'
3. p7SK5'+3'Maxi

Abbildung 4B: Analyse des S₁-Experiments mit radioaktiv markierter DNA mit parallel analysierter Maxam-Gilbert-Sequenzierung des eingesetzten DNA-Fragmentes (C,C+T,A+G,G). Die durch *in-vitro* Transkription mit verschiedenen Konstrukten erzeugten RNAs wurden mit dem an der Eco RV-Schnittstelle 5'-endmarkierten Pst I-Eco RV-Fragment aus pAT 5'7SK hybridisiert und dann die Hybride der Verdauung durch die S₁-Nuklease ausgesetzt. Die zur Hybridisierung eingesetzte RNA wurde durch die *in-vitro* Transkription unter Verwendung von S100-Extrakt und den folgenden DNA-Matrizen synthetisiert:

1. p7SK5'+3' ■. Marker
2. p7SK5'+3'Maxi
3. pAT 5'7SK

Der Pfeil kennzeichnet das Initiationsnukleotid im kodogenen DNA-Strang.

DNA-Fragmente in einem hochauflösenden Polyacrylamid-Harnstoffgel zusammen mit einer Maxam-Gilbert-Sequenzierung des eingesetzten Pst I-Eco RV-Fragments. Der Vergleich der Sequenzierung mit den geschützten Banden zeigt in Anbetracht der 1,5 nt Verschiebung zwischen der chemischen Sequenzierung und der enzymatischen S₁-Nuklease-Verdauung (106), daß der Startpunkt der Transkription der mit dem Pfeil gekennzeichnete C-Rest des codogenen Strangs der Vektorsequenz ist. Die Transkripte beginnen also mit einem G-Rest, der im Vergleich mit dem Wildtypgen der Position -2 entspricht. Das war insofern ein erstaunliches Ergebnis, als an Position +1 bezüglich des Wildtyps ein G-Rest zu finden ist (siehe Abbildung 8).

Die zweite Bande beim Konstrukt p7SK5'+3'Maxi (Spur 2) liegt, wie erwartet, in der Größenordnung von 163 nt und erklärt sich aus der Duplikation der pAT153-Sequenz (zwischen der Cla I- und der Eco RV-Schnittstelle) in diesem Konstrukt.

Selbst das Konstrukt pAT 5'7SK (Spur 3), das kein Terminationssignal besitzt und daher in der direkten Analyse der in-vitro synthetisierten RNA keine definierten Transkripte liefert, zeigt eine genauso effiziente und korrekte Expression wie die anderen Konstrukte.

Alle diese Daten zeigen, daß die 5'-flankierende Sequenz des 7S K RNA Gens bis Position -242 allein vollständig für die Initiation der Transkription durch die RNA Polymerase III verantwortlich ist. Das 7S K RNA Gen besitzt also einen rein genexternen Promotor (73,107). Wie in 4.4. noch erläutert wird, ist dieser externe Promotor auch in-vivo allein in der Lage, die korrekte und effiziente Transkription durch die RNA Polymerase III zu steuern (107).

4.1.3. Die Funktionalität der "TATA"-Box im 7S K RNA Gen-Promotor

Betrachtet man die 5'-flankierende Promotor-Sequenz des 7S K Gens genauer, so erkennt man an Position -25 bis -32 die Sequenz TTTATATA. Diese Sequenz ähnelt sehr der als "TATA"-Box bezeichneten Sequenz des "core"-Promotors von Pol II-Genen. Daher stellte sich die Frage, ob diese Sequenz bei der Transkription des 7S K Gens durch die RNA-Polymerase III eine Bedeutung hat. Um dies zu analysieren, wurden Substitutionsklone erzeugt, bei denen die Sequenz von -9 bis -40 durch Vektorsequenzen ersetzt wurde. Dazu wurde nach Restriktion des Plasmids p7SK/DE mit Kpn I in Richtung auf die Pst I-Schnittstelle mit Hilfe der Bal 31-Exonuklease die DNA schrittweise abgebaut. Nach Abstoppen der Bal 31-Verdauung wurde der Ansatz mit Klenow-Enzym behandelt und dann die DNA mit Pst I nachrestringiert. Nach elektrophoretischer Auf-

trennung der erhaltenen Fragmente wurden die Fragmente der gewünschten Größe (etwa 20 bis 40 bp kürzer als das Pst I-Kpn I-Fragment aus p7SK/DE) isoliert und in den pUC8 Vektor kloniert, der mit Acc I (Enden aufgefüllt) und Pst I restringiert worden war. Die so erhaltenen Zwischenklone wurden mit Eco RI verdaut, die Enden aufgefüllt und die DNA dann mit Pst I nachrestringiert. Die so erzeugten Fragmente wurden nach Gelelektrophorese isoliert und in einen pSPT 19-Vektor eingefügt, der vorher das Kpn I-Eco RI-Fragment aus p7SK/DE (das 7S K Gen) aufgenommen hatte und mit Pst I und Sma I restringiert worden war. Diese Klonierung ergab die Konstrukte p7SKd23 (enthielt noch die "TATA"-Box) und p7SKd38 (ohne "TATA"-Box, siehe Abbildung 5).

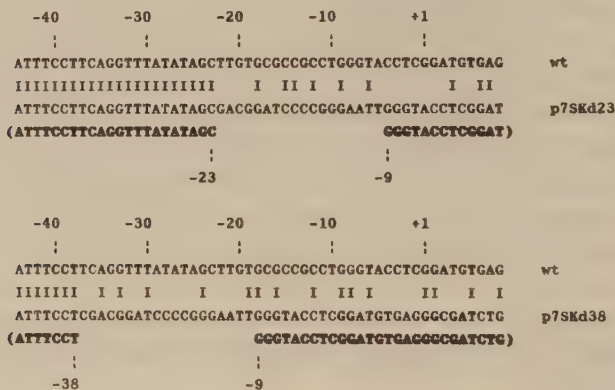


Abbildung 5: Vergleich der Sequenz im Initiations-Bereich zwischen den Subklonen p7SK/DE und p7SKd23 bzw. p7SKd38

Die *in-vitro* Transkription mit diesen Konstrukten (Abbildung 6) als Matrize zeigte, daß der Subklon ohne "TATA"-Box (p7SKd38, Spur 2) nicht exprimiert wird, während der mit "TATA"-Box und Substitution von -9 bis -23 (p7SKd23, Spur 3) in etwa genau so aktiv transkribiert wird wie der Wildtyp (Spur 4).

Also hat die "TATA"-Box in 7S K-Promotor eine essentielle Bedeutung bei der Transkription des 7S K Gens, was Experimente von Murphy et al. bestätigten (73). Neben der zur *in-vitro* Transkription notwendigen DNA-Sequenz im Bereich der Position -60 (dieser DNA-Bereich zeigt Homologie zu

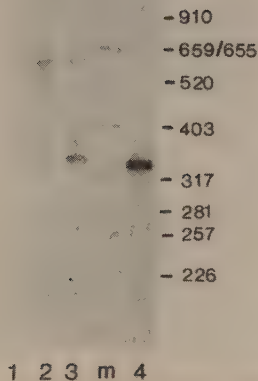


Abbildung 6:

Autoradiographie der gel-elektrophoretischen Analyse der Produkte der *in-vitro* Transkription mit S100-Extrakt und den folgenden Konstrukten als Matrize der Reaktion:

1. pUC8 Kontrolle auf Vektor-Transkripte
2. p7SKd38 TATA-Box deletiert
3. p7SKd23
4. p7SK/DE Wildtyp
- . Marker pYH48 restringiert mit Alu I

der PSE-Sequenz der U snRNA Gene; 22) ist also auch die "TATA"-Box zum "core"-Promotor des 7S K Gens zu rechnen.

Das Phänomen, daß in Pol III-Promotoren Sequenzelemente zu finden sind, die auch unverzichtbarer Bestandteil der Promotoren des Pol II-Systems sind, findet sich auch im genexternen Promotor des U₆ snRNA Gens wieder (21,22,57).

4.1.4. Bedeutung der Sequenz am Initiationspunkt für die Transkription des 7S K RNA Gens

Im Rahmen der in 4.4. beschriebenen *in-vivo* Analysen der Transkription des 7S K Gens wurde zur Normierung der Transfektionseffektivität ein interner Standard benötigt. Dazu wurde der Subklon p7SK/DE-Maxi mit Kpn I und Cla I restringiert, die überhängenden DNA-Enden mit Mung Bohnen Nuklease abgedaut und der Restvektor nach Abtrennung des herausgeschnittenen Fragments religiert. Dadurch entstand der Subklon p7SK5' + 3'd K/C. Analog wurde der Subklon p7SK5' + 3'd A/C erzeugt; dabei

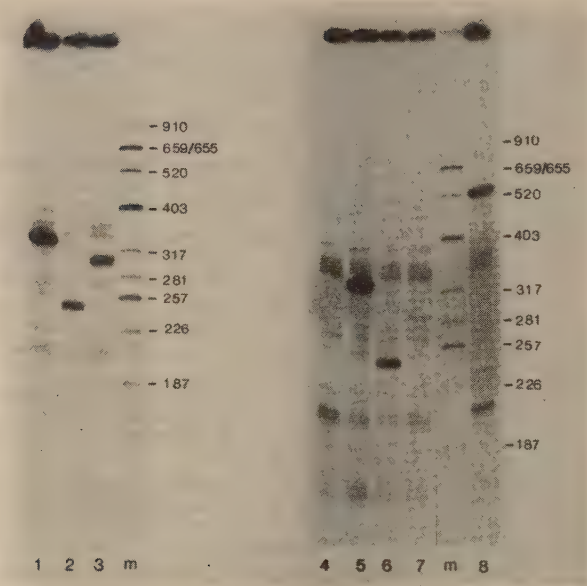


Abbildung 7: Autoradiogramm der gelelektrophoretischen Analyse der Produkte der in-vitro Transkription mit S100-Extrakt und den folgenden DNA-Matrizen:

1. p7SK/DE
2. p7SK5'+3'
3. p7SK5'+3'd A/C
4. pUC8
5. wie 1
6. wie 2
7. p7SK5'+3'd K/C
8. p7SK/DE-Maxi

m. Marker pYH48 restringiert mit Alu I

wurde der Subklon p7SK/DE-Maxi mit Asp 718 und Cla I verdaut, die Enden aufgefüllt und der Restvektor religiert.

Die Abbildung 7 zeigt die Produkte der in-vitro Transkription dieser beiden Konstrukte im Vergleich mit dem Wildtyp-Konstrukt p7SK/DE (Spur 1). Nur der Subklon p7SK5'+3'd A/C wird exprimiert. Es trat die erwartete Transkriptbande (Spur 3, 302 nt) auf. Das Konstrukt p7SK5'+3'd K/C ist dagegen in-vitro (Spur 7; und in-vivo) inaktiv.

Betrachtet man nun die Sequenz dieser Konstrukte im Vergleich mit dem Wildtyp und dem Konstrukt p7SK5'+3' (Abbildung 8), so erkennt man die deutlichen Unterschiede im Bereich der Initiationsregion. Während beim Wildtyp vor dem Initiationsnukleotid (ein G-Rest) 4 Pyrimidine (CCTC) zu finden sind und in den Konstrukten p7SK5'+3' und p7SK5'+3'd A/C noch 2 Pyrimidine (CC), ist in dem passenden Sequenzbereich des Konstruktes p7SK5'+3'd K/C keine solche Sequenzfolge mehr zu erkennen. Neuere Untersuchungen beim U₆ snRNA Gen von *Xenopus* (57) haben gezeigt, daß bei diesem Pol III-Gen die Mutation des Initiationsnukleotids (ein G-Rest) und auch die Veränderung der in diesem Bereich zu findenden Pyrimidine (Sequenz lautet dort TCGT) die Effektivität der Transkription stark reduzieren können.

```

          +1
          |
      TTTATATAGCTTGTGCGCCGCCCTGGGTACCTCGGATGTGAGGGCGATC   p7SK/DE

          +1
          |
      TTTATATAGCTTGTGCGCCGCCCTGGGTACCGAGCTCGAATTCTCATGT   p7SK5'+3'
      *****                                     * * *
      TTTATATAGCTTGTGCGCCGCCCTGGGTACCGATAAGCTTTAATGCGGT   p7SK5'+3'd A/C

          +1
          |
      TTTATATAGCTTGTGCGCCGCCCTGGGTACCGAGCTCGAATTCTCATGT   p7SK5'+3'
      *****                                     * * *
      TTTATATAGCTTGTGCGCCGCCCTGGTAAGCTTTAATGCGGTAGTTTAT   p7SK5'+3'd K/C
  
```

Abbildung 8: Vergleich der Sequenz im Initiationsbereich zwischen den Konstrukten p7SK/DE, p7SK5'+3', p7SK5'+3'd A/C und p7SK5'+3'd K/C

4.2. Austausch der 5'-flankierenden Sequenzen zwischen dem 7S K und dem 7S L RNA Gen

Neben dem 7S K RNA Gen wurde in der Arbeitsgruppe Benecke auch ein funktionelles 7S L RNA Gen isoliert (68,70,108).

Dieses 7S L Gen lag als Subklon pUC8 7SL (105) vor, der sich aus der Klonierung eines etwa 600 bp großen genomischen Hind III-Dra I-Fragments in pUC8 (restringiert mit Hind III und Sma I) ableitet.

Ullu et. al. (52) hatten 1985 gezeigt, daß für die effiziente und korrekte Initiation der Transkription in-vitro und in-vivo die 5'-flankierende Sequenz dieses 7S L Gens benötigt wird; ein Subklon mit nur noch 37 bp 5'-flankierender Sequenz zeigt nur noch 50 % Aktivität, ein solcher mit Sequenz bis -2 ist inaktiv. Das 7S L Gen zeigt eine "A-Box"-Homologie bei Position +4 bis +14. Eine "B-Box"-Homologie ist nicht auszumachen (109).



Abbildung 9: Schematische Darstellung des Konstrukts pUC8 7SL

A = A-Box-Homologie

Schnittstellen für Restriktionsenzyme:

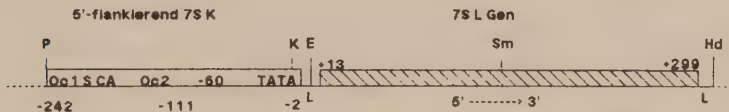
Bs = Bst EII; E = Eco RI; Hd = Hind III; P = Pst I;
Sm = Sma I

Zu Beginn meiner Untersuchungen war anzunehmen, daß die in-vitro Transkription der beiden 7S RNA Gene sehr ähnlich reguliert wird. Bei beiden Genen schien die Expression von der Interaktion zwischen einem genexternen und einem geninternen Promotor-Element abzuhängen. Bevor die Ergebnisse der in-vitro Analyse des 7S K Gens gezeigt hatten, daß der 7S K Promotor rein genextern angesiedelt ist, wurde daher untersucht, ob die 5'-flankierenden Sequenzen der beiden 7S RNA Gene untereinander austauschbar sind. Es sollte analysiert werden, ob z.B. der 5'-flankierende Promorteil des 7S L Gens mit den geninternen Sequenzen des 7S K Gens so interagieren kann, daß ein korrekt transkribiertes Hybrid-Konstrukt entsteht.

4.2.1. In-vitro Transkription des Konstrukts pUC8 5'K-LG

Zur Erzeugung eines DNA-Konstruktes, das nur die 7S L Gensequenz enthält, wurde der Subklon pUC8 7SL mit Pst I linearisiert, durch Verdauung der DNA mit der Exonuklease Bal 31 die Sequenz in Richtung Genbeginn entfernt, die Enden mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllt und der Ansatz mit Eco RI restringiert. Die Fragmente der gewünschten Größe wurden dann in M13mp18 (verdaut mit Eco RI und Sma I) integriert, wodurch der Zwischenklon M13 7S LG entstand. Dieses Konstrukt enthielt die 7S L Gensequenz ab der Position +13. Das Hind III-Eco RI-Fragment aus diesem Zwischenklon wurde zusammen mit dem Pst I-Eco RI-Fragment aus pAT 5'K in pUC8 (restringiert mit Pst I und Eco RI) integriert, wodurch der Subklon pUC8 5'K-LG (105) entstand, dessen Struktur in Abbildung 10A gezeigt wird.

Die Spur 3 der Abbildung 10B zeigt die Produkte der in-vitro Transkription des Konstrukts pUC8 5'K-LG im Vergleich mit denen der Plasmide p7SK/DE (Spur 1, 7S K-Wildtyp) und pUC8 7SL (Spur 2, 7S L-Wildtyp). Diese Spur läßt deutlich ein spezifisches Transkript von 315 nt erkennen, dessen Spezifität durch Hybridselektion (Spur 5) und S₁-Analyse (Spur 6) überprüft wurde.



Sequenz im Fusionsbereich:

K-DNA	Vektor	L-DNA
<-----I		I----->
GGGTACCGagctcgaattcgagctcgggtacccGGCGCGTG		
-9 -3		+13 +20

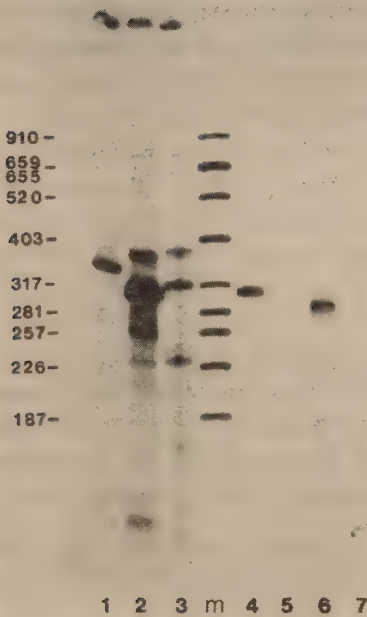
Abbildung 10A: Schematische Darstellung des Konstrukts pUC8 5'K-LG

L = Poly-Linker-Sequenz des Vektors

Schnittstellen für Restriktionsenzyme:

E = Eco RI; Hd = Hind III; K = Kpn I; P = Pst I
Sm = Sma I

Abbildung 10B: In-vitro
Transkription des Konstrukts
pUC8 5'K-LG



Die Produkte der in-vitro Transkription mit S100-Extrakt und dem zirkulären Plasmid pUC8 5'K-LG wurden entweder direkt in einem 6% Polyacrylamidgel mit 8 M Harnstoff analysiert oder nach Hybridselektion bzw. S₁-Analyse auf dieses Gel aufgetragen.

1. - 3. direkte Analyse der Produkte der Transkription mit folgenden Matrizen:

1. p7SK/DE Wildtyp 7S K
2. pUC8 7SL Wildtyp 7S L
3. pUC8 5'K-LG

4. - 5. die Produkte der in-vitro Transkription wurden zur Hybridisierung mit dem Hind III-Eco RI-Fragment aus pUC8 7SL eingesetzt und die hybridisierenden Nukleinsäuren wieder abgeschmolzen.

4. Hybridselektion mit markierten Nukleinsäuren aus 2.
5. Hybridselektion mit markierten Nukleinsäuren aus 3.

6. die Produkte der in-vitro Transkription mit pUC8 5'K-LG wurden mit dem Hind III-Eco RI-Fragment aus pUC8 7SL hybridisiert und die Hybride der Verdauung durch die S₁-Nuklease ausgesetzt (Verkürzung der Bande auf den zum 7S L Gen homologen Teil der Transkripte).

7. wie 6. jedoch erfolgte die Hybridisierung mit reiner pUC8 DNA linearisiert mit Hind III

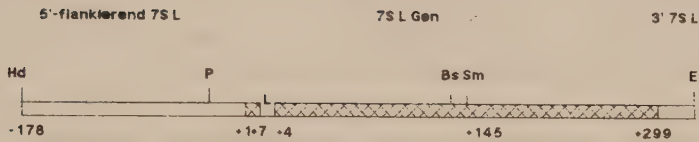
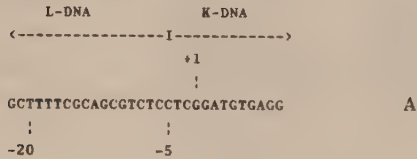
Das Initiations-Nukleotid der Transkription in pUC8 5'K-LG ist der G-Rest der Vektorsequenz, der sich unmittelbar 3' an die Kpn I-Schnittstelle anschließt, was auch zuvor für das Konstrukt p7SK5'+3' gezeigt worden war (siehe 4.1.4., 108).

4.2.2. In-vitro Transkription des Subklons pAT 5'L-KG

Zur Konstruktion eines Subklons, der die 5'-flankierende Sequenz des 7S L Gens möglichst im passenden Abstand vor dem 7S K Gen enthält, wurde nach Linearisierung des Plasmids pUC8 7SL mit Bst EII die DNA mit Hilfe der Nuklease Bal 31 in Richtung Genbeginn abgedaut, der Ansatz mit Kle-



Sequenz an der Fusionsstelle:



Sequenz an der Fusionsstelle:

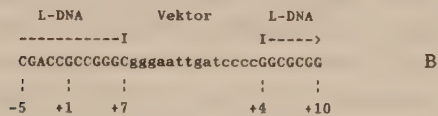


Abbildung 11A: Schematische Darstellung des Konstrukts pAT 5' L-KG

11B: Schematische Darstellung des Konstrukts pUC8 5' L-LG

L = Poly-Linker-Sequenz des Vektors

Schnittstellen für Restriktionsenzyme:

Bs = Bst EII; E = Eco RI; Hd = Hind III; P = Pst I
Sm = Sma I

C

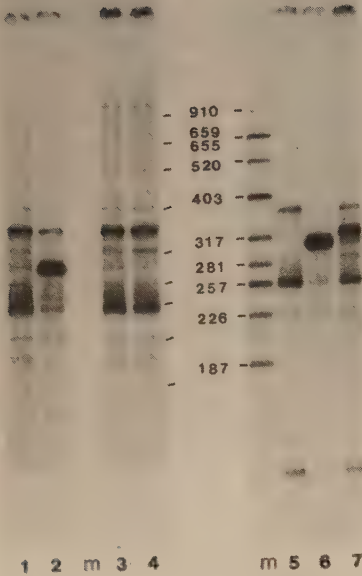


Abbildung 11C:

Analyse der Produkte der in-vitro Transkription mit S100-Extrakt und den folgenden DNA-Matrizen:

1. pAT153 DNA Kontrolle
2. pUC8 7SL Wildtyp 7S L
3. pUC 5'L(+7)-KG
4. pAT 5'L-KG
5. pUC8 DNA Kontrolle
6. wie 2.
7. pUC8 5'L-LG

now-Enzym behandelt, die DNA mit Hind III restringiert und Fragmente der korrekten Länge isoliert (Fragmente mit 5'-flankierend 7S L). Das das 7S K Gen enthaltende Fragment wurde durch Restriktion des Plasmids p7SK/DE mit Kpn I, Abdauen der überstehenden Enden mit Mung Bohnen Nuklease und Restriktion mit Eco RI isoliert. Diese Fragmente wurden zusammen in pAT153 (linearisiert mit Hind III und Eco RI) eingefügt, wodurch der Subklon pAT 5'L-KG entstand (110), dessen Struktur in der Abbildung 11A dargestellt wird.

Die Abbildung 11C zeigt die Produkte der in-vitro Transkription dieses Subklons (Spur 4) im Vergleich mit denen reiner pAT153 Vektor DNA (Spur 1) oder pUC8 7SL DNA (Spur 2). Es ist kein spezifisches Transkript zu erkennen. Spur 3 zeigt die Produkte der Transkription mit dem Konstrukt pUC 5'L(+7)-KG, das die 5'-flankierende Sequenz ab Position -178 (Hind III) und die 7S L Gensequenz bis zur Position +7 vor das 7S K Gen kloniert enthält (105). Auch hier ist wieder kein spezifisches Transkript zu erkennen.

Um auszuschließen, daß diese negativen Ergebnisse durch einen nicht korrekten Abstand der 5'-flankierenden 7S L-Sequenz zum 7S K Gen zustandekommen (nicht korrektes "spacing"), wurde ein DNA-Konstrukt erzeugt, bei dem die 5'-flankierende Sequenz des 7S L Gens durch eine Insertion von 18 bp Vektorsequenz von seiner kodierenden Sequenz separiert ist (pUC8 5'L-LG, Bild 11B). Dazu wurde aus dem Zwischenklon pUC8 5'L(+7) (105), der die 5'-flankierende Sequenz des 7S L Gens ab Position -178 und die 7S L Gensequenz bis Position +7 kloniert in pUC8 (restringiert mit Hind III und Sma I) enthält, das Hind III-Eco RI-Fragment (Eco RI-Ende aufgefüllt) isoliert. Der Subklon pUC8 7S LG, der ein "blunt"-Eco RI-Fragment aus pUC8 7SL, kloniert in die Sma I und die Eco RI-Schnittstelle des Vektors, enthält und die 7S L Gensequenz ab Position +4 zeigt, wurde mit Bam HI restringiert, die Enden aufgefüllt und die DNA mit Hind III nachverdaut. Die Integration des Fragmentes aus pUC8 5'L(+7) in diesen Vektor ergab das Konstrukt pUC8 5'L-LG (110), dessen in-vitro Transkription in Spur 7 der Abbildung 11C gezeigt ist. Es ist ein spezifisches Transkript von 317 nt Länge zu erkennen, wenn auch die Effektivität der Transkription im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist.

Diese Ergebnisse zeigten, daß die 5'-flankierende Sequenz des 7S L Gens nicht in der Lage ist, mit den geninternen Sequenzen des 7S K RNA Gens so zu interagieren, daß in der in-vitro Transkription aktive Hybrid-Konstrukte entstehen. Weiterhin zeigen die Experimente, daß der 7S L Gen-promotor einen genexternen und geninternen Anteil besitzt, wobei die Insertion von Vektorsequenz zwischen die beiden Promotorteile zwar nicht zur vollständigen Inaktivierung führt, die Anordnung beider Teile zueinander aber doch wichtig ist. Das 7S L Gen besitzt also einen "split"-Promotor (108).

4.3. Bestimmung der geninternen Promotor-Sequenzen des 7S L Gens

Zur genauen Analyse der geninternen Promotorsequenzen des 7S L RNA Gens wurde eine Reihe von DNA-Konstrukten erzeugt, bei denen Mutationen in den 5'-Teil des Gens eingeführt wurden.

Im ersten Schritt wurden Deletionen in den codierenden Bereich des 7S L Gens eingeführt. Dazu wurde das Plasmid pUC8 7SL mit Sma I linearisiert, die DNA-Sequenz mit Exonuklease Bal 31 in Richtung Genbeginn abgedaut und nach Klenow-Behandlung mit Hind III restringiert. Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden nach Größenselektion in einem Agarosegel in die DNA des Subklons pUC8 7SL, der mit Hind III und Sma I restringiert worden war, reintegriert. Die in-vitro Transkription der so erhaltenen Deletionsklone p7SL/+73/+145 (110), p7SL/+23/+145 (Spur 2, Abbildung 13),

p7SL/+18/+145 (Spur 3, Abbildung 13) und p7SL/+11/+145 (Spur 4, Abbildung 13) zeigte, daß diejenigen Konstrukte, die die 5'-Gensequenz bis Position +18 enthalten, in-vitro aktiv waren.

Das 7S L Gen weist von Position +4 bis +14 eine "A-Box"-Homologie auf, ein bei tRNA Genen essentieller Promotorbestandteil (21), der beim 7S K Gen (siehe 4.1.4.; 73,107) und beim U₆ snRNA Gen (21,54) keine funktionelle Bedeutung hat.

		-70				-50	
		I				I	
		GTCGCCCGCGCGTGGCCCCCGCTCCCAATGACGT					
		-40				-10	
		I				I	
		AACTGCCCTGCAGCTTCTAGTAGCTTTCCGACCGT					
		-8	+1	+7	+11	+18	+23
		I	I	I	I	I	I
wt		CTCCGACCGCCGGCGCGCGTGGCGCTGCCTGTAGT					
		aktiv					
+23/+145		CTCCGACCGCCGGCGCGCGTGGCGCTGCCTGggag					
		aktiv					
+22/pAT/E		CTCCGACCGCCGGCGCGCGTGGCGCTGCCgGgaaT					
		aktiv					
+18/+145		CTCCGACCGCCGGCGCGCGTGGCGCGGgagcgggg					
		aktiv					
		IIIIIIIIIIIIIIIIII II IIIII I					
+11/+145		CTCCGACCGCCGGCGCGCGGgGgCGGgaccAcc					
		nicht aktiv					
+7L/K-Gen		CTCCGACCGCCGGCGCGGaatggtacCtcGgAtT					
		nicht aktiv					
-5L/K-Gen		CTCctcggatgtGagGgcGatctGgcTCGgacatcT					
		nicht aktiv					
del A-Box		CTCCGACCGCCGGCGCGGaatGCGGtaCccggcg					
		aktiv					

+7L/pAT/E		CTCCGACCGCCGGCGCGGaatGtCaTGttTGacag					
		nicht aktiv					
		IIIIIIIIIIIIIIIIII I					
+7L/pAT/C		CTCCGACCGCCGGCGCGGaatGgataagCttAaT					
		aktiv					

Abbildung 12: Vergleich der Sequenzen im Bereich der Fusions-Stelle der 7S L Konstrukte

Große Buchstaben = gleiche Sequenz wie das Wildtyp-Gen

Daher sollte im nächsten Schritt der Analyse untersucht werden, ob die "A-Box"-Homologie den geninternen Promotor des 7S L Gens darstellt. Dazu wurde eine Reihe von Konstrukten erzeugt, deren Sequenz im Initiationsbereich der Transkription in Abbildung 12 dargestellt ist.

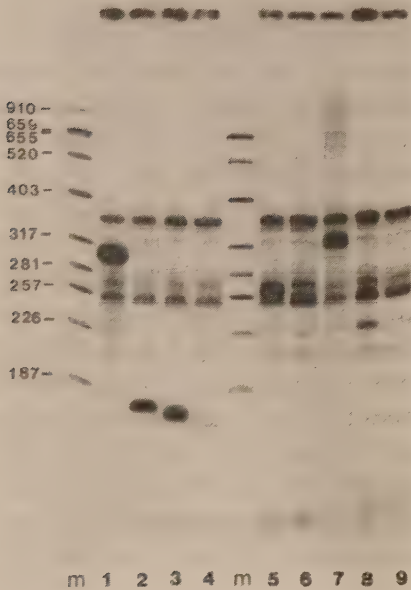


Abbildung 13:

Analyse der Produkte der in-vitro Transkription mit S100-Extrakt und den 7S L Konstrukten als Matrice der Reaktion. Als DNA-Matrize wurden eingesetzt:

1. pUC8 7SL Wildtyp
2. p7SL/+23/+145
3. p7SL/+18/+145
4. p7SL/+11/+145
5. pUC8 5'L(+22)-pAT/E
6. pUC8 5'L(+7)-pAT/E
7. p7SL/del A-Box
8. pUC8 5'L(+7)-pAT/C
9. pUC8 DNA Kontrolle

■. Marker pYH48 restringiert mit Alu I

Das Konstrukt p7SL/del A-Box entstand durch Klonierung des Hind III-Eco RI-Fragments aus pUC8 5'L(+7) (siehe 4.2.2.;105) mit dem Eco RI-Hind III-Fragment aus pUC8 5'L-LG (siehe 4.2.1.;105) in pAT153 als Vektor (restringiert mit Hind III).

Das Konstrukt pUC8 5'L(+22)-pAT/E entstand durch Insertion des Eco RI-Eco RI-Fragments aus p7SK5'+3' (siehe 4.1.4.) in die Eco RI-Schnittstelle des Plasmids pUC8 5'L(+22) (105), das die 5'-flankierende Sequenz des 7S L Gens (ab -178) und das 7S L Gen (bis +22) kloniert in die Hind III- und Sma I-Schnittstelle von pUC8 enthält.

Die Konstruktion des Subklons pUC8 5'L(+7)-pAT/E erfolgte durch die Integration des Eco RI-Eco RI-Fragments aus p7SK5'+3' in die Eco RI-Schnittstelle des Plasmids pUC8 5'L(+7).

Der Subklon pUC8 5'L(+7)-pAT/C wurde durch Integration des Cla I-Eco RI-Fragments (Enden aufgefüllt) aus p7SK5'+3' in die mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllte Eco RI-Schnittstelle des Plasmids pUC8 5'L(+7) erzeugt.

Abbildung 13 zeigt nun die Ergebnisse der in-vitro Transkription mit diesen Konstrukten.

Der Vergleich der Sequenz (Abbildung 12) zwischen dem aktiven Konstrukt p7SL/+18/+145 (Bild 13, Spur 3) und dem inaktiven Konstrukt p7SL/+11/+145 (Bild 13, Spur 4) läßt erkennen, daß sich diese beiden Konstrukte im Fusions-Bereich bis zur Position +21 nur an 2 Positionen unterscheiden, dem T-Rest bei +12 und dem C-Rest bei +15. Der T-Rest an der Position +12 scheint keine essentielle Promotorfunktion zu haben, da bei den aktiven Konstrukten p7SL/del A-Box (Bild 13, Spur 7) und pUC8 5'L(+7)-pAT/C (Bild 13, Spur 8) auch der T-Rest durch einen A-Rest ersetzt worden ist. Es ist zwar nicht ganz auszuschließen, daß eine T zu G Transversion nicht toleriert wird, während eine T zu A Transition möglich ist. Dies ist aber in diesem Fall recht unwahrscheinlich, da bei dem inaktiven Konstrukt p7SL/+11/+145 sonst der ganze restliche DNA-Bereich gleich blieb, während bei den aktiven Konstrukten p7SL/del A-Box und pUC8 5'L(+7)-pAT/C die ganze Region um Position +12 mutiert wurde und dies eigentlich stärkere Auswirkungen haben sollte. Der Vergleich des inaktiven Konstrukts pUC8 5'L(+7)-pAT/E (Bild 13, Spur 6) mit dem aktiven Subklon pUC8 5'L(+7)-pAT/C (Bild 13, Spur 8) zeigt, daß beide Konstrukte bei +12 einen A-Rest enthalten.

Der C-Rest an Position +15 und der G-Rest an Position +16 scheint dagegen einen essentiellen Bestandteil des Promotors darzustellen, denn nur die Konstrukte mit der Sequenz CG an +15/+16 sind aktiv. Weder der C-Rest allein bei +15 (pUC8 5'L(+7)-pAT/E) noch der G-Rest allein bei +16 (pAT 5'L-KG, siehe 4.2.2.) führten zu aktiven Konstrukten.

Die Sequenz CG bei Position +15/+16 ist nicht Bestandteil der "A-Box"-Homologie (+4 bis +14). Konstrukte, bei denen die 3'-Hälfte der "A-Box"-Homologie, die Sequenz GGTGG, durch die Eco RI-Schnittstelle, GAATTC, ersetzt worden ist, sind dann aktiv, wenn an Position +15/+16 die Sequenz CG enthalten ist (p7SL/del A-Box, pUC8 5'L(+7)-pAT/C).

Die relativ schwache Expression des Konstrukts pUC8 5'L(+7)-pAT/C im Vergleich mit p7SL/del A-Box, die beide bis +17 die gleiche Sequenz aufweisen, ist wahrscheinlich durch die Sequenz GCTTTAATGCGG direkt in

siert und dann der S₁-Nuklease-Verdauung ausgesetzt. Als Kontrolle dienten einmal das Konstrukt p7SK5'+3' (Bild 14, Spur 1) und zum anderen pUC8 DNA (Bild 14, Spur C) als Matrize der Transkription. Beim Konstrukt pUC8 5'L(+7)-pAT/C (Bild 14, Spur 4) findet sich die Bande des erwarteten, 163 nt langen geschützten Fragmentes, während nach der pUC8 5'L(+7)-pAT/E Transkription (Bild 14, Spur 3) keine geschützte Bande zu erkennen ist. Reproduziert ist auch die schlechtere Expression des Plasmids pUC8 5'L(+7)-pAT/C im Vergleich zu pUC8 5'L(+22)-pAT/E (Bild 14, Spur 2). Die Reduktion der Länge der geschützten Fragmente bei Einsatz der 7S L-pAT-Konstrukte im Vergleich zu dem bei Einsatz des Subklons p7SK5'+3' erklärt sich aus der Klonierung.

Diese Daten zeigen, daß die in-vitro Transkription des 7S L RNA Gens von einem "split"-Promotor kontrolliert wird, der sich genintern maximal bis Position +18 erstreckt, wobei die Sequenz CG bei Position +15/+16 als essentieller Bestandteil des Promotors anzunehmen ist.

Parallele Experimente mit Hilfe der DNase I-Verdauungsschutz-Methode ("DNase I footprinting"), die von Sebastian Bredow in der Arbeitsgruppe unternommen wurden, bestätigen diese Daten. Ein durch S100-Extraktprotein vor der DNase I-Verdauung geschützter Bereich im 5'-Teil des 7S L Gens erstreckte sich von Position -3 bis +16 (Bredow et al. eingereicht).

4.4. Analysen zur in-vivo Expression des 7S K RNA Gens

Viele Untersuchungen zeigen, daß bei in-vitro Analysen von genregulatorisch wichtigen DNA-Sequenzen oft nur die "core"-Promotorsequenzen beschrieben werden können. Die Wirkungen vieler modulierender Sequenzen, die die Expression der Gene z.T. sehr stark beeinflussen können, sind oftmals in-vitro nicht nachzuweisen. Erst bei der Analyse in-vivo ist die Wirkung dieser Sequenzen dann festzustellen.

Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch die Bedeutung der 5'-flankierenden Sequenzen des 7S K Gens auf dessen Expression in-vivo untersucht.

4.4.1. Die in-vivo Expression des 7S K Gens ist von der 5'-flankierenden Sequenz im Bereich von -111 bis -242 abhängig.

Zur Analyse der in-vivo Expression des 7S K Gens waren solche DNA-Konstrukte einzusetzen, deren zu erwartende Transkripte nicht schon endogen in den Zellen vorhanden sind. Andernfalls ist der Nachweis der Expression solcher Konstrukte nicht möglich. Daher wurden in allen in-vivo Experimenten solche Konstrukte eingesetzt, die als zu transkribierende

DNA-Sequenz das Eco RI-Eco RV-Fragment aus pAT153 fusioniert mit dem Hinf I-Eco RI-Fragment aus p7SK/DE enthalten. Dies entspricht dem Konstrukt p7SK5'+3', dem Ausgangsklon aller dieser Konstrukte (siehe 4.1.4., weiterhin als Wildtyp bezeichnet). Zur Analyse wurde, nach der Transfektion der Zellen mit den verschiedenen DNA-Konstrukten mit Hilfe der Methode der Kalziumphosphat-DNA-Kopräzipitations-Technik, etwa nach 48 Stunden Expressionszeitraum die totale zelluläre RNA isoliert und diese mit dem an der Eco RV-Schnittstelle radioaktiv markierten Pst I-Eco RV-Fragment aus pAT 5'7SK hybridisiert. Nach Verdauung der Hybride mit S₁-Nuklease wurden die durch Transkripte geschützten DNA-Fragmente in Polyacrylamid-Harnstoffgelen analysiert. Bei korrekter Initiation der Transkription waren geschützte DNA-Fragmente von 196 nt Länge zu erwarten.

Die in-vitro Analyse hatte gezeigt, daß die 5'-flankierende Sequenz des 7S K Gens bis zur Position -67 zur Expression des 7S K Gens notwendig und auch ausreichend ist (71,107).

Um zu untersuchen, ob diese 5'-flankierende Sequenz des 7S K Gens auch in-vivo die korrekte und effiziente Transkription durch die RNA Polymerase III steuern kann, wurden in einem ersten Schritt 2 DNA-Konstrukte in HeLa-Zellen verglichen: einmal das Plasmid p7SK5'+3', das die 5'-flankierende Sequenz von -242 bis -2 enthält (Wildtyp-Promotor), und zum anderen das Plasmid p111/7SK5'+3', das die 5'-flankierende Sequenz nur bis zur Position -111 (siehe Abbildung 20A) zeigt. Dieser Subklon entstand durch die Integration des 119 Eco RI-Kpn I-Fragments (Eco RI-Ende aufgefüllt) aus p69.2 (69) in den Vektor, der sich nach der Restriktion von p7SK5'+3' mit Pst I, Abdauen der überstehenden Enden mit Mung Bohnen Nuklease und Restriktion mit Kpn I ergab.

Abbildung 15 zeigt den Vergleich der in-vitro und der in-vivo Expression der Konstrukte p7SK5'+3' und p111/7SK5'+3'. Wie die Intensität der durch die Transkripte geschützten DNA-Fragmente (196 nt) zeigt, ist die Expression der Konstrukte (A Spur 2, p7SK5'+3'; A Spur 3, p111/7SK5'+3') in-vitro etwa gleich stark (man könnte sogar sagen, daß p111/7SK5'+3' etwas besser exprimiert zu wird). Bei der in-vivo Transkription dagegen ist nur bei p7SK5'+3' (B Spur 2) deutlich ein geschütztes DNA-Fragment zu erkennen. Das Konstrukt p111/7SK5'+3' wird in-vivo (B Spur 3) so schwach exprimiert, daß dies so kaum nachzuweisen ist.

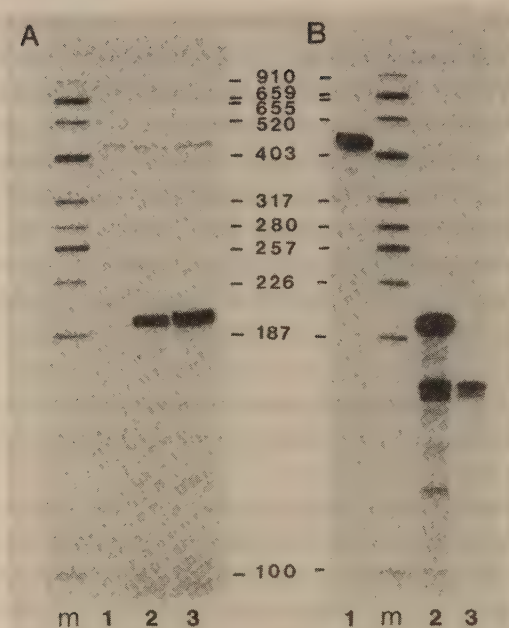


Abbildung 15:

Vergleich der in-vitro und in-vivo Expression der Subklone p7SK5'+3' und p111/7SK5'+3'

A: Nicht radioaktiv markierte RNA aus der in-vitro Transkription wurde mit dem an der Eco RV-Schnittstelle radioaktiv markierten Pst I-Eco RV-Fragment aus pAT 5'7SK hybridisiert und der Ansatz dann mit S₁-Nuklease verdaut. Die Produkte der Reaktion wurden auf einem denaturierenden Harnstoffgel analysiert. Als Matrize der Transkription diente:

1. pUC8 DNA
2. p7SK5'+3'
3. p111/7SK5'+3'

B: 20 µg totalcelluläre RNA aus HeLa Zellen, die mit 25 µg DNA der Konstrukte transfektiert worden waren, wurden zur S₁-Analyse zusammen mit dem radioaktiv markierten Pst I-Eco RV-Fragment eingesetzt (Kontrolle der Transfektionseffizienz durch Kotransfektion von 12,5 µg des Konstrukts p7SK5'+3'd A/C).

1. eingesetztes Pst I-Eco RV-Fragment aus pAT 5'7SK (435 nt)
2. p7SK5'+3' in die Zellen eingeschleust
3. p111/7SK5'+3' in die Zellen eingeschleust

m: Marker pYH48 restringiert mit Alu I

Zur Normierung der Transfektionseffizienz, die Schwankungen unterliegt, wurde bei allen Transfektionen der Subklon p7SK5'+3'd A/C (siehe 4.1.6.) als Kontrolle kotransfiziert. Dessen Transkripte schützen DNA-Fragmente von 163 nt Länge vor der S1-Nuklease-Verdauung. Diese DNA-Fragmente sind auch deutlich als Bande in der Abbildung 15B zu erkennen. Darunter tritt eine weitere Bande auf, die um etwa 10 nt verkürzt ist. Die Analyse der transkribierten Sequenz im Subklon p7SK5'+3' dA/C (siehe 4.1.6.) zeigt, daß am 5'-Ende der zu erwartenden Transkripte eine A/T-reiche Sequenz auftritt, was bei S1-Analysen oftmals zu verkürzten geschützten DNA-Fragmenten führen kann. Die Analyse gesamtzellulärer RNA aus Zellen, die nur mit dem Subklon p7SK5'+3'd A/C transfiziert wurden, zeigte die Spezifität dieser Doppelbande an (Abbildung 21B, Spur 6).

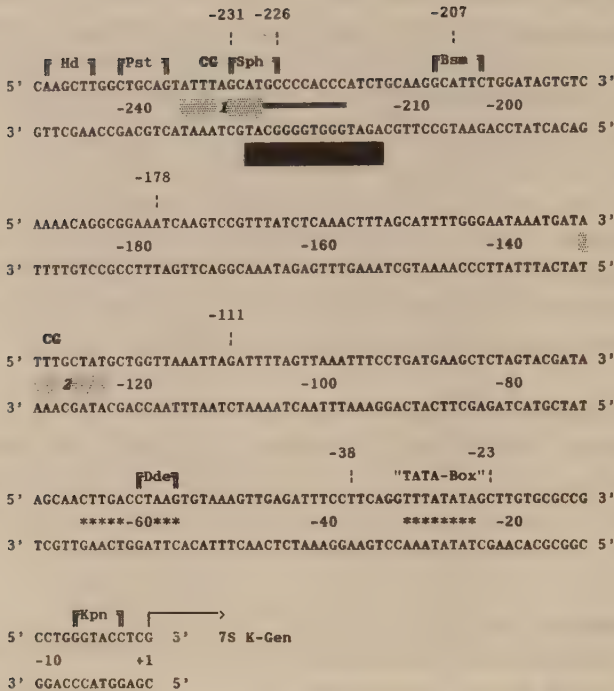
Diese Experimente belegen, daß der "core"-Promotor des 7S K Gens (die 5'-flankierende Sequenz bis zur Position -67) allein keine effiziente in-vivo Transkription steuern kann. Es sind darüber hinaus 5'-flankierende Sequenzen von Position -242 bis -111 zur effizienten in-vivo Expression notwendig.

4.4.2. "Enhancer"-Analysen

Die Experimente unter 4.4.1. hatten gezeigt, daß die distale 5'-flankierende Sequenz des 7S K Gens von Position -242 bis -111 eine wichtige aktivierende Sequenz für die in-vivo Expression durch den 7S K Promotor enthält. Eine genauere Analyse dieser Sequenz, wie in Bild 16 dargestellt, zeigt die Existenz zweier, dem Oktamer-Motiv (ATTTGCAT) weitgehend homologer Sequenzen um Position -129 (proximal) und -233 (distal) an.

Dieses Oktamer-Motiv ist ein funktioneller Bestandteil der "enhancer"-Sequenzen des U₆ snRNA Gens und verschiedener Protein-codierender Gene, wie z.B. beim Histon H2B Gen und dem Gen der leichten Kette der Immunglobuline (46). Im Gegensatz zu der Konsensus-Sequenz ATTTGCAT zeigen die beiden Oktamer-Homologien der 5'-flankierenden 7S K Sequenz jeweils die Insertion einer Base (proximale Homologie : ATTTGCTAT; distale Homologie : ATTTAGCAT). Jedoch finden sich auch in den "enhancer"-Sequenzen verschiedener Proteingene funktionelle Oktamer-Homologien, die Abweichungen zur Konsensus-Sequenz (z.B. CTTTGCAT, SV40-"enhancer" 46) aufweisen.

Daher war es naheliegend anzunehmen, daß der beobachtete Effekt der distalen 5'-flankierenden Sequenz auf die in-vivo Expression des 7S K Gens durch diese Oktamer-Homologien zu erklären sei. Es sollte unter-



1 = Oktamer-Homologien 1 = distal 2 = proximal

*** = durch Deletion definierte für die in-vitro Transkription essentielle Bereiche

■ = "DNase I-footprint"

— = "CACCC-Box"-Homologie

CG = Mutation der Oktamer-Homologien

| = 5'-Position der verschiedenen Deletionsklone

⌞X⌟ = Schnittstelle einer Restriktions-Endonuklease

Bsm = Bsm I; Dde = Dde I; Hd = Hind III; Kpn = Kpn I; Pst = Pst I; Sph = Sph I

Abbildung 16: 5'-flankierende Sequenz des 7S K Gens mit wichtigen Sequenzmotiven

sucht werden, ob diese Oktamer-Homologien, ähnlich wie beim U6 snRNA Gen, tatsächlich eine "enhancer"-Funktion auf die Expression des 7S K Gens ausüben. Weiterhin sollte parallel dazu untersucht werden, ob ein diese Oktamer-Homologien enthaltendes DNA-Fragment (die Sequenz von -242 bis -60) in der Lage ist, auf einen Promotor des Pol II-Systems als ein "enhancer" zu wirken.

Bei allen in-vivo Analysen unter Verwendung von 7S K Sequenzen wurde das Kontroll-Plasmid p7SK5'+3'd A/C kotransfiziert. Die einzelnen Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt. Die Auswertung der verschiedenen Experimente erfolgte so, daß die cpm-Werte der 196 nt-Bande (durch die Transkripte der zu untersuchenden Promotor-Konstrukte geschütztes Fragment) durch die der 163 nt-Bande (durch die Transkripte des Kontroll-Plasmids p7SK5'+3'd A/C geschütztes Fragment) dividiert wurden. Dadurch ergab sich der Wert der relativen Transkriptionsleistung (RTL;111). Durch Vergleich der RTL-Werte der einzelnen Konstrukte mit dem des Wildtyp-Konstrukts p7SK5'+3' konnten dann die relativen Expressionsraten in % bestimmt werden.

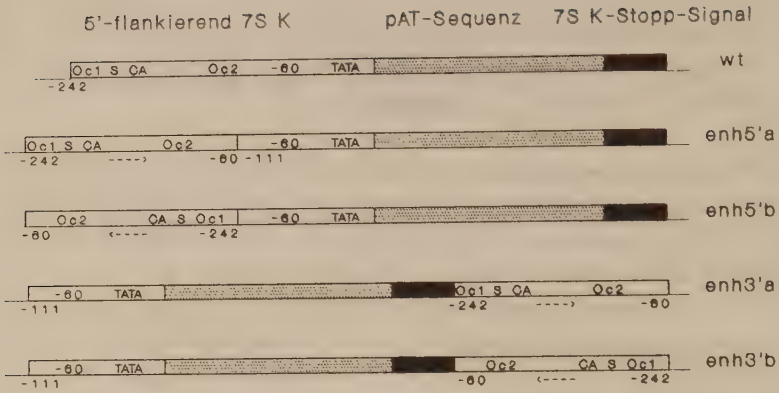
4.4.2.1. Konstruktion und in-vivo Expression der Subklone penh5'a, penh5'b, penh3'a und penh3'b

Zur Untersuchung der "enhancer"-Wirkung der distalen 5'-flankierenden Sequenz des 7S K Gens auf seinen "core"-Promotor wurde dieser Bereich von Position -242 bis -60 in beiden Orientierungen sowohl stromauf- (5') wie stromabwärts (3') zur Transkriptionseinheit in Konstrukte integriert, deren Struktur schematisch in Abbildung 17A gezeigt ist.

Zur Konstruktion des Subklons penh5'a wurde das Pst I-Dde I-Fragment aus p7SK/DE (Dde I-Ende aufgefüllt) zusammen mit dem Eco RI-Kpn I-Fragment aus pδ9.2 (69, Eco RI-Ende aufgefüllt) in den Vektor kloniert, der sich nach Restriktion des Subklons p7SK5'+3' mit Pst I und Kpn I ergab.

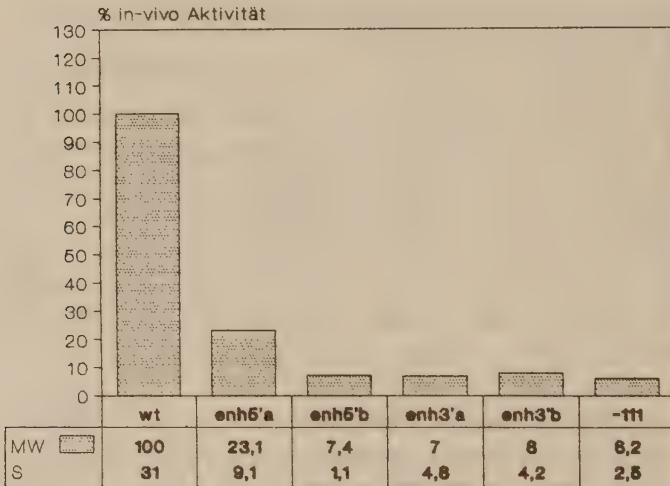
Bei der Erstellung von penh5'b wurde das Hind III-Dde I-Fragment aus p7SK/DE (Dde I-Ende aufgefüllt) gemeinsam mit dem Hind III-Kpn I-Fragment aus p111/7SK5'+3' in den Vektor kloniert, der sich nach Restriktion des Plasmids p7SK5'+3' mit Pst I, Entfernung der überstehenden Enden mit Mung Bohnen Nuklease und Restriktion mit Kpn I ergab.

Zur Konstruktion der Subklone penh3'a und penh3'b wurde das Hind III-Kpn I-Fragment (Hind III-Ende aufgefüllt) und das Kpn I-Eco RI-Fragment (Eco RI-Ende aufgefüllt) aus dem Plasmid p111/7SK5'+3' zusammen in den Vektor pSPT19 kloniert, der mit dem Restriktionsenzym Xba I ge-



Oc = Oktamer-Homologien; S = Sph-Box-Homologie;
CA = "CACCC"-Box; TATA = "TATA"-Box; -60 = PSE

A



B

Abbildung 17A: Schematische Darstellung der Konstrukte penh5'a, penh5'b, penh3'a und penh3'b

17B: Schematische Darstellung der in-vivo Expressionsrate dieser Konstrukte

MW = Mittelwert; S = Standardabweichung

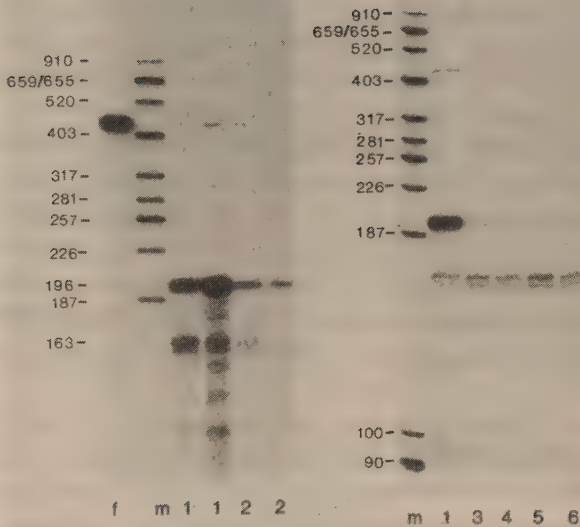


Abbildung 18: Analyse der *in-vivo* Expression der Subklone penh5'a, penh5'b, penh3'a und penh3'b

Aus HeLa-Zellen, die mit DNA verschiedener Konstrukte transfektiert worden waren, wurde die totalzelluläre RNA isoliert und 20 µg dieser RNA zusammen mit dem an der Eco RV-Schnittstelle radioaktiv markierten Pst I-Eco RV-Fragment aus pAT 5'7SK zur S₁-Analyse eingesetzt (Kontrolle der Effizienz der Transfektion durch Kotransfektion von p7SK5'+3'd A/C).

Zur Transfektion wurden eingesetzt:

1. p7SK5'+3'
2. penh5'a
3. penh5'b
4. penh3'a
5. penh3'b
6. p111/7SK5'+3'

m. = Marker pYH48 restringiert mit Alu I

f. = eingesetztes Pst I-Eco RV-Fragment

schnitten und dann mit Klenow-Enzym behandelt worden war. In diesen Zwischenklon wurde das Hind III-Dde I-Fragment (beide Enden aufgefüllt) aus p7SK/DE in die Sma I-Schnittstelle integriert, wobei sowohl penh3'a als auch penh3'b entstanden. Bei diesen Konstrukten befindet sich die 5'-

flankierende Sequenz des 7S K Gens (-242 bis -60) etwa 60 bp vom Ende der Transkriptionseinheit entfernt.

Die Abbildung 18 zeigt die Autoradiographie der Gele, in denen die Produkte der S₁-Analyse mit RNA aus Zellen, die mit den Konstrukten penh5'a (Spur 2), penh5'b (Spur 3), penh3'a (Spur 4) und penh3'b (Spur 5) transfektiert worden waren, analysiert wurden. Die Auswertung mehrerer solcher Experimente ist in Abbildung 17B wiedergegeben.

Diese Abbildungen zeigen deutlich, daß keines der Konstrukte die Expressionsrate des Wildtyps erreicht. Lediglich das Konstrukt penh5'a zeigt eine Aktivität (23,1 %), die über der des Deletionsklons p111/7SK5'+3' (6,2%) liegt. (Kontroll-Experimente mit einem pSPT-Wildtyp-Konstrukt, das die 5'-flankierende Sequenz des 7S K Gens bis -242 enthielt, zeigten, daß kein Unterschied der Expressionsrate im Vergleich zu p7SK5'+3' festzustellen war. Danach sind also auch pSPT-Vektoren zu in-vivo Analysen geeignet.)

Diese Experimente zeigten eindeutig, daß die distale 5'-flankierende Sequenz des 7S K Gens von Position -242 bis -111 nicht als klassischer "enhancer" auf den "core"-Promotor des 7S K Gens wirkt. Nur in der korrekten Orientierung und im korrekten Abstand zum proximalen "core"-Promotor entfaltet diese distale Sequenz ihre volle Wirkung.

4.4.2.2. Konstruktion und in-vivo Expression der Subklone pA₁₀7SKenh5'a und pA₁₀7SKenh5'b

Parallel zu den unter 4.4.2.1. gezeigten Experimenten wurde die "enhancer"-Wirkung der distalen 5'-flankierende 7S K Sequenz auf einen Promotor des Pol II-Systems untersucht. Dafür wurde die Methode der CAT(Chloramphenicol-Acetyltransferase)-Analyse gewählt (83).

Das Hind III-Dde I-Fragment aus p7SK/DE (beide Enden aufgefüllt) wurde in die aufgefüllte Bgl II-Schnittstelle des Vektors pA₁₀CAT (84) integriert, wobei die Konstrukte pA₁₀7SKenh5'a und pA₁₀7SKenh5'b entstanden, deren Struktur schematisch in Abbildung 19A dargestellt ist.

Mit den in Bild 19A gezeigten Konstrukten wurden HeLa-Zellen transfektiert und nach einer Expressionszeit von 48 Stunden aus ihnen ein Cytoplasma-Extrakt gewonnen. Dieser Extrakt wurde dann für das "CAT-assay" eingesetzt. Die Abbildung 19B zeigt die Autoradiographie der Dünnschichtplatte, auf der die Reaktionsprodukte der unterschiedlichen Ansätze aufgetrennt worden waren.

Wie die Abbildung 19B deutlich macht, ist im Vergleich zu dem Plasmid pA₁₀CAT (Spur 2, 0-Wert, nur SV40-Promotor vor dem CAT Gen) bei den

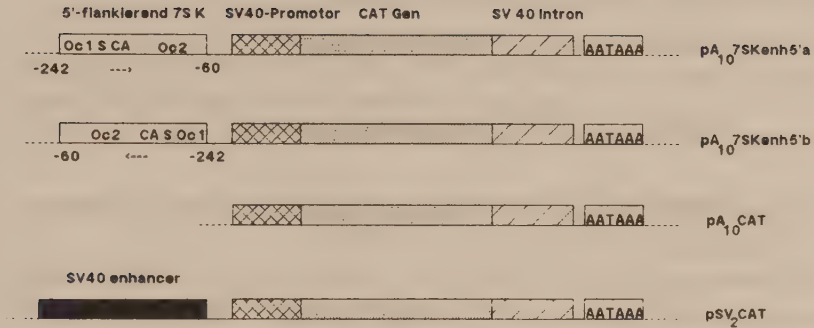


Abbildung 19A: Schematische Darstellung der "CAT"-Konstrukte

Oc = Oktamer-Homologie (1 = distal, 2 = proximal)

CA = "CACCC"-Box-Homologie

S = Sph-Box-Homologie

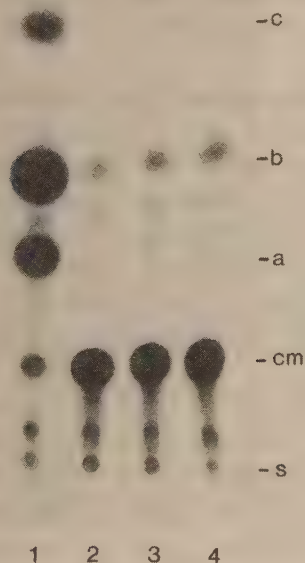
AATAAA = Polyadenylierungssignal aus SV40

Abbildung 19B:

Autoradiographie der
Dünnschichtplatte, auf
die die Reaktionsprodukte
des "CAT-assay" mit Ex-
trakten aus Zellen ana-
lysiert wurden, die mit
den folgenden Konstrukten
transfiziert worden waren:

- 1 pSV₂CAT (100 %)
- 2 pA₁₀CAT (0-Wert)
- 3 pA₁₀7SKenh5'a
- 4 pA₁₀7SKenh5'b

s = Auftragungspunkt
cm = Chloramphenicol
a = 1-Acetat CM
b = 3-Acetat CM
c = 1,3-Diacetat CM



Konstrukten pA107SKenh5'a und pA107SKenh5'b (Spur 3 bzw. 4) keine Zunahme der Aktivität zu erkennen. Dies wurde auch durch Bestimmung der Radioaktivität der Reaktionsprodukte einzelner Ansätze in Relation zum nicht umgesetzten ^{14}C -Chloramphenicol bestätigt.

Das für die in-vivo Expression des 7S K Gens essentielle distale Sequenz-Element ist also nicht in der Lage, auf einen Promotor des Pol II-Systems oder seinen eigenen "core"-Promotor als "enhancer" zu wirken.

4.4.3. Eingrenzung des zur in-vivo Expression des 7S K Gens notwendigen 5'-flankierenden distalen Sequenz-Elements

Nachdem die "enhancer"-Analysen gezeigt hatten, daß die distale 5'-flankierende, stimulierende Sequenz des 7S K Gens ein orts- und orientierungsspezifisches Verhalten zeigt, sollte das zur in-vivo Expression notwendige distale Sequenz-Element (DSE) genauer eingegrenzt werden. Dazu wurden zwei Wege beschritten.

Einmal wurden Konstrukte erzeugt, die durch Deletion von der Pst I-Schnittstelle (Position -242) aus in Richtung Genbeginn immer weniger 5'-flankierende Sequenz des 7S K Gens enthielten.

Um die Funktionalität der Oktamer-Homologien direkt zu analysieren, wurde mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese in ihnen Mutationen eingeführt, wobei in beiden Fällen die zentralen T-Reste (ATTTGCAT) durch die Sequenz CG ersetzt wurden.

4.4.3.1. In-vivo Expression der 5'-Deletionsklone

Die Abbildung 20A zeigt schematisch die erhaltenen Konstrukte, die eine fortschreitende Deletion der distalen 5'-flankierenden Sequenz aufweisen. Das Konstrukt p231/7SK5'+3' entstand durch Klonierung des Sph I-Pvu II-Fragmentes aus p7SK5'+3' in pUC18, restringiert mit Sph I und Sma I. Der Subklon p226/7SK5'+3' wurde aus dem Wildtyp-Konstrukt p7SK5'+3' durch Restriktion mit Pst I und Sph I, Entfernung der überstehenden Enden mit Hilfe der Mung Bohnen Nuklease und Religation des Vektors erzeugt.

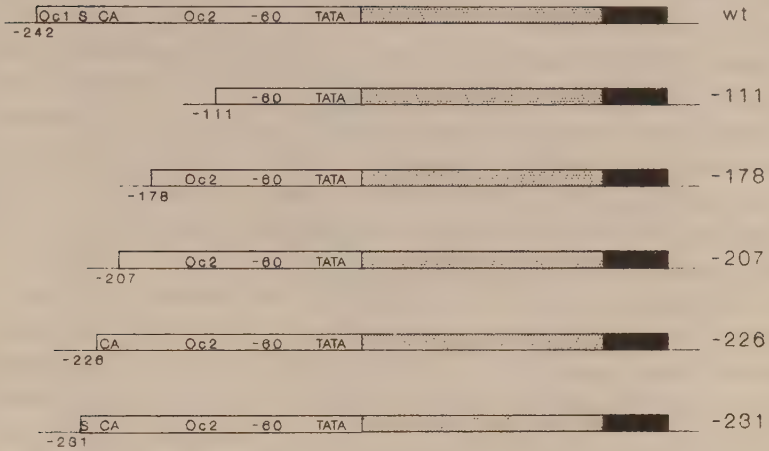
Das Konstrukt p207/7SK5'+3' entstand analog aus p7SK5'+3' durch Restriktion mit Pst I und Bsm I, Verdauung mit Mung Bohnen Nuklease und Religation des Vektors.

Zur Konstruktion des Subklons p178/7SK5'+3' wurde nach Linearisierung des Plasmids p7SK5'+3' mit Pst I die DNA-Sequenz in Richtung Genbeginn mit Bal 31-Exonuklease entfernt, die Enden aufgefüllt und nach Restriktion mit Kpn I die Fragmente der gewünschten Größe isoliert. Diese Frag-

5'-flankierend 7S K

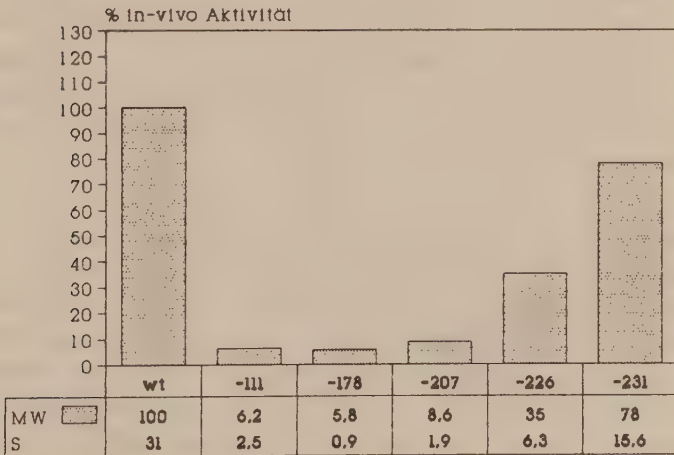
pAT-Sequenz

7S K-Stopp-Signal



Oc = Oktamer-Homologien; S = Sph-Box-Homologie;
 CA = "CACCC"-Box; TATA = "TATA"-Box; -60 = PSE

A



B

Abbildung 20A: Schematische Darstellung der Deletions-Konstrukte mit fortschreitend weniger 5'-flankierender Sequenz

20B: Schematische Darstellung der in-vivo Expressionsrate dieser Konstrukte

MW = Mittelwert; S = Standardabweichung

mente wurden in den Vektor kloniert, der sich nach Restriktion des Plasmids p7SK5'+3' mit Pst I, Verdauung mit Mung Bohnen Nuklease und Restriktion mit Kpn I ergab.

Alle diese Deletions-Konstrukte wurden in HeLa-Zellen transfektiert und ihre in-vivo Expression mit der des Wildtyp-Konstrukts p7SK5'+3' verglichen. Abbildung 21 zeigt die Autoradiographie denaturierender Polyacrylamid-Harnstoffgele, die zur Analyse der durch die in-vivo Transkripte der verschiedenen Klone geschützten DNA-Fragmente genutzt wurden.

In Abbildung 20B ist die Auswertung einer Reihe solcher Experimente mit diesen Deletionskonstrukten graphisch dargestellt.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß der Deletionsklon p207/7SK5'+3' kaum noch exprimiert wird. Die zur Expression in-vivo notwendige Sequenz muß also stromaufwärts der Position -207 lokalisiert sein. Die proximale Oktamer-Homologie bei Position -125 bis -133 hat demnach keinen Einfluß auf die in-vivo Expression. Der Subklon p226/7SK5'+3' zeigt noch 35 % Aktivität bei Vergleich mit dem Wildtypkonstrukt, während der Deletionsklon p231/7SK5'+3' beinahe noch Wildtypaktivität aufweist (78 %). Damit ist das DSE zwischen -231 und -207 der 5'-flankierenden Sequenz des 7S K Gens zu suchen. Dieser Bereich umfaßt nicht das distale Oktamer-Motiv (-229 bis -237), und somit ist die stimulierende Funktion der DSE-Sequenz nicht auf die Oktamer-Homologie zurückzuführen. Die leichte Reduktion der Expressionsrate des Subklons p231/7SK5'+3' ist möglicherweise durch die Veränderung der benachbarten Sequenzen zu erklären, die die Bindung eines zur in-vivo Expression notwendigen Proteinfaktors (siehe unten) bereits leicht verschlechtert.

4.4.3.2. In-vivo Expression der durch ortsspezifische Mutagenese erzeugten DNA-Konstrukte

Parallel zur Analyse mit Hilfe der Deletionsklone wurde durch ortsspezifische Mutation der Oktamer-Homologien deren Rolle bei der in-vivo Expression des 7S K Gens untersucht. Dazu wurde das Pst I-Kpn I-Fragment aus dem Subklon p7SK5'+3' in den Vektor M13mp18 kloniert. Mit Hilfe der Oligonukleotide OL1 (CTGCAGGTATCGAGCATGCC, distale Homologie) und OL2 (AATGATATCGGCTATGCTGG, proximale Homologie) wurden die Oktamer-Homologien mutiert, wobei eine Taq I- bzw. eine Eco RV-Schnittstelle in die erhaltenen Konstrukte eingeführt wurde. Nach erfolgreicher Mutagenese wurden die Pst I-Kpn I-Fragmente aus den M13mp18-Zwischenklonen in den Vektor reintegriert, der nach Restriktion des Wildtyp-Konstrukts p7SK5'+3' mit Pst I und Kpn I entstand. Als Produkte wurden die beiden

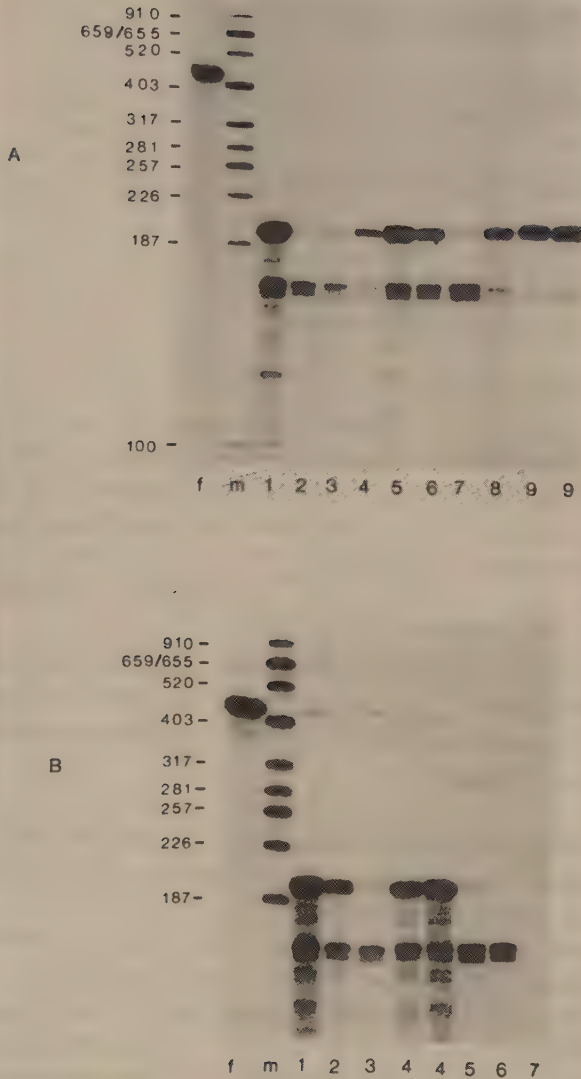


Abbildung 21: Analyse der *in-vivo* Expression der Subklone zur Bestimmung der distalen 5'-flankierenden, stimulierenden Sequenz.

Aus HeLa-Zellen, die mit DNA verschiedener Konstrukte transfektiert worden waren, wurde die totalzelluläre RNA isoliert und 20 µg dieser RNA zusammen mit dem an der Eco RV-Schnittstelle radioaktiv markierten Pst I-Eco RV-Fragment aus pAT 5'7SK zur S₁-Analyse eingesetzt (Kon-

trolle der Effizienz der Transfektion durch Kotransfektion von p7SK5'+3'd A/C).

Zur Transfektion wurden eingesetzt:

- | | | | |
|----|----------------------|----|----------------------------|
| A: | 1. p7SK5'+3' | B: | 1. p7SK5'+3' |
| | 2. p111/7SK5'+3' | | 2. p226/7SK5'+3' |
| | 3. p207/7SK5'+3' | | 3. p178/7SK5'+3' |
| | 4. p7SK/BsmpUC-111 | | 4. p231/7SK5'+3' |
| | 5. p7SK5'+3'Oc2m | | 5. p111/7SK5'+3' |
| | 6. p226/7SK5'+3'Oc2m | | 6. p7SK5'+3'd A/C (allein) |
| | 7. p7SKSphpAT-130 | | 7. pUC8 (ohne Kontrolle) |
| | 8. p226/7SK5'+3' | | |
| | 9. p7SK5'+3'Oc1m | | |

m. = Marker pYH48 restringiert mit Alu I
f. = eingesetztes Pst I-Eco RV-Fragment

Konstrukte p7SK5'+3'Oc1m (distale Oktamer-Homologie ist mutiert) und p7SK5'+3'Oc2m (Mutation der proximalen Oktamer-Homologie) erhalten.

Der Subklon p226/7SK5'+3'Oc2m entstand aus p7SK5'+3'Oc2m durch Restriktion mit Pst I und Sph I, Entfernung der Enden mit Mung Bohnen Nuklease und Religation des Vektors.

Abbildung 22A zeigt im oberen Teil eine schematische Darstellung dieser Konstrukte.

Die S₁-Analyse zur in-vivo Expression dieser Klone ist mit in der Abbildung 21 wiedergegeben, während die Abbildung 22B die graphische Darstellung der Auswertung mehrerer solcher Transfektionsexperimente mit diesen Subklonen darstellt.

Wie die Abbildungen deutlich zeigen, hat die Mutation der proximalen Oktamer-Homologie keine Auswirkung auf die Expression des Konstrukts p7SK5'+3'Oc2m (105,2 % Expression).

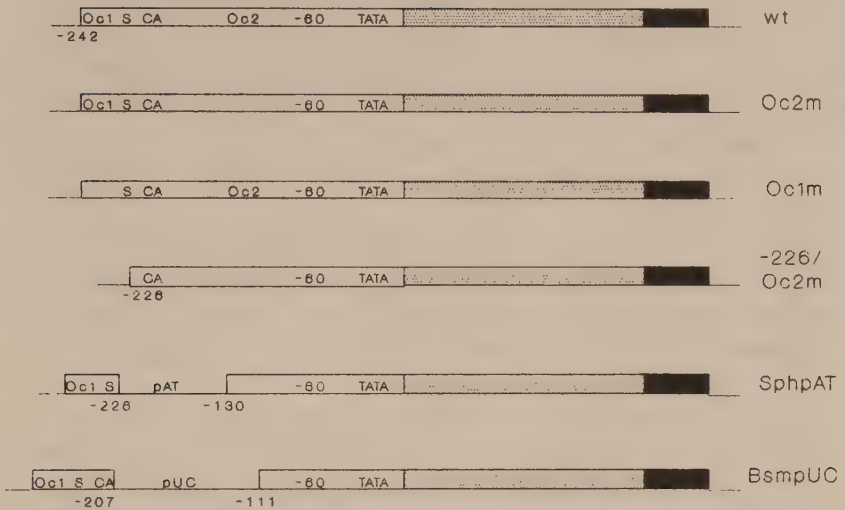
Ebenso hat die Mutation der proximalen Oktamer-Homologie keinen Einfluß auf die in-vivo Expression des Subklons p226/7SK5'+3'Oc2m. Dieser Subklon zeigt in etwa die gleiche Aktivität (36,7 %) wie das Konstrukt p226/7SK5'+3' (35 %), das sich auch bis zur Position -226 erstreckt.

Der Subklon p7SK5'+3'Oc1m, der die Mutation der distalen Oktamer-Homologie aufweist, zeigt eine fast so große Expressionsrate (78,2 %) wie der Wildtypklon. Auch hier ist die leichte Reduktion der Aktivität möglicherweise durch die Veränderung der Randsequenz zu erklären, da zwei AT-Paare durch CG-Paare ersetzt wurden.

5'-flankierend 7S K

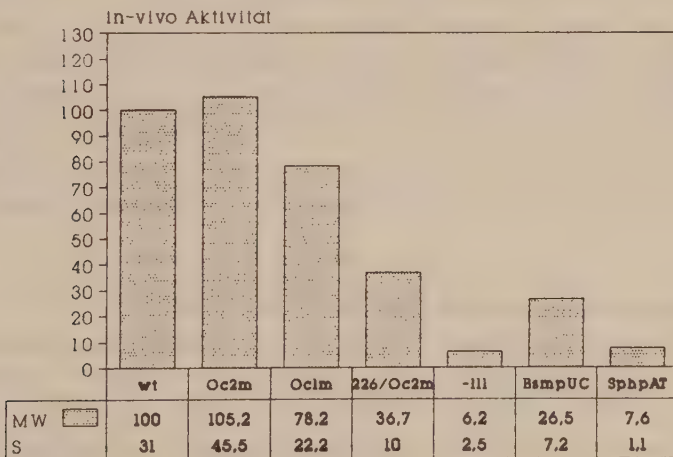
pAT-Sequenz

7S K-Stopp-Signal



Oc = Oktamer-Homologien; S = Sph-Box-Homologie;
 CA = "CACCC"-Box; TATA = "TATA"-Box; -60 = PSE

A



B

Abbildung 22A: Schematische Darstellung der Konstrukte mit Mutation der Oktamer-Homologien und der Substitutionsklone

22B: Schematische Darstellung der in-vivo Expressionsrate dieser Konstrukte

MW = Mittelwert; S = Standardabweichung

Die genaue Analyse der distalen 5'-flankierenden Sequenz des 7S K Gens (Bild 16) und die gemeinsame Betrachtung der Ergebnisse, die in 4.4.3.1. und 4.4.3.2. dargestellt werden, läßt folgende Aussagen zu:

Sowohl die Deletionsklone als auch die Klon mit mutierter Sequenz der Oktamer-Homologien zeigen, daß diesen Motiven bei der in-vivo Expression des 7S K Gens keine Bedeutung zukommt.

Die zur Expression notwendige distale Sequenz findet sich im Bereich der Positionen -231 bis -207.

Diese DSE-Sequenz zeigt die Sequenz CCCCACCC, die homolog zu der bei der in-vivo Analyse der Promotorstruktur des β -Globingens (111) und des Tryptophan Oxygenase Gens (112,113) definierten "CACCC"-Box ist, ein Promotor-Element, das also für das Pol II-System beschrieben worden ist.

Zur Bestätigung dieser Daten wurden von Sebastian Bredow DNase I-"footprint"-Experimente durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten, daß Kern-Extrakt-Protein aus HeLa-Zellen sowohl bei dem Wildtyp-Subklon p7SK5'+3' als auch bei dem Mutationsklon p7SK5'+3'Oclm die gleiche DNA-Sequenz vor der Verdauung durch die DNase I schützt. Der "footprint" erstreckt sich von Position -229 bis -215 und liegt somit zentral über dem "CACCC"-Motiv wie die Abbildung 23 zeigt.

Dieser "footprint" liefert auch die Erklärung für die auf über 30 % reduzierte Aktivität der Subklone p226/7SK5'+3' und p226/7SK5'+3'Oc2m; bei diesen Konstrukten sind schon Teile der Bindungssequenz für den bindenden Faktor deletiert. Auch die etwas reduzierte Expression der Subklone p231/7SK5'+3' und p7SK5'+3'Oclm ist, wie erwähnt, durch die Veränderung der Sequenz in der unmittelbaren Nähe der Bindungsregion erklärbar.

4.4.3.3. In-vivo Expression von Substitutionskonstrukten

Zur Bestätigung der essentiellen Funktion "CACCC"-Box innerhalb des DSE in der distalen 5'-flankierenden Sequenz des 7S K Gens (Position -231 bis -207) wurden zum Abschluß zwei Substitutionskonstrukte erzeugt, bei denen die Sequenz zwischen der Bsm I- bzw. der Sph I-Schnittstelle und dem "core"-Promotor des 7S K Gens durch prokaryote Vektorsequenz ersetzt wurden. Der untere Teil der Abbildung 22A zeigt die schematische Darstellung dieser beiden Konstrukte.

Zur Konstruktion des Subklons p7SK/BsmpUC-111 wurde der Wildtypklon p7SK5'+3' mit Bsm I restringiert, die überstehenden Enden entfernt und dann die DNA mit Kpn I restringiert. In diesen Vektor wurde das Pvu II-

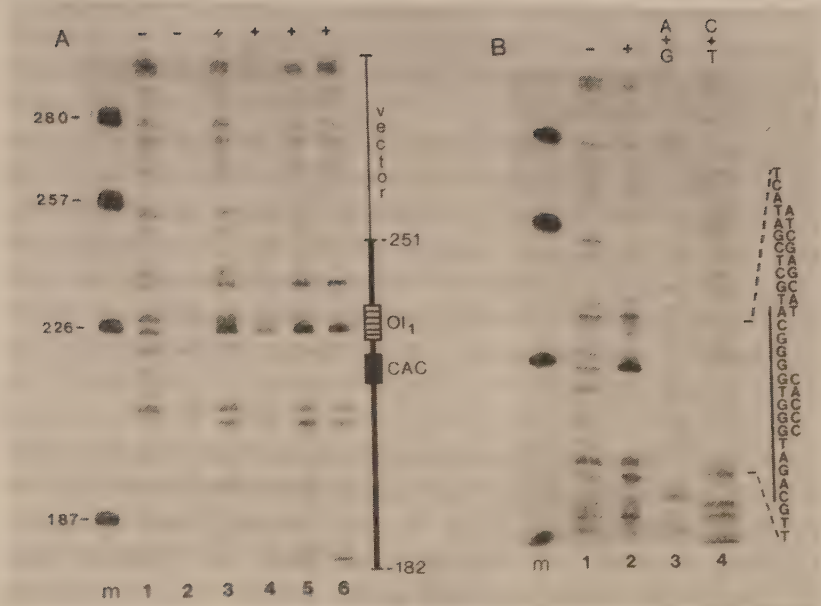


Abbildung 23: DNase I "footprint" Analyse des kodierenden Stranges des DSE (S.Bredow).

Das an der Asp 718-Schnittstelle 5'-endmarkierte 340 bp lange Asp 718-Pvu II-Fragment aus dem Subklon p7SK5' + 3' (A, Wildtyp-Promotor) oder aus dem Konstrukt p7SKL5' + 3'Ocl (B, distale Oktamer-Homologie mutiert) wurde mit variierenden Mengen an Kern-Extrakt-Protein (114,115) und DNase I inkubiert (116,117).

A: Das Wildtyp-Promotor Fragment wurde verdaut unter Einsatz folgender Mengen an Extrakt-Protein und DNase I:

- 1./2. ohne Protein, 2,5 ng DNase I (1.) bzw. 5,0 ng DNase I (2.)
3. 10 µg Protein, 5 ng DNase I; 4. 20 µg Protein, 10 ng DNase I
5. 50 µg Protein, 20 ng DNase I; 6. 100 µg Protein, 50 ng DNase I

Ocl = distale Oktamer-Homologie; CAC = "CACCC"-Box

B: Verdauung des Asp 718-Pvu II-Fragments aus p7SKL5' + 3'Ocl:

1. ohne Extrakt-Protein, 2,5 ng DNase I (Kontrolle)
2. 50 µg Extrakt-Protein, 20 ng DNase I

A+G und C+T = Maxam-Gilbert Sequenzierung des DNA-Fragments

Die Sequenz des DSE-Elements wird an der rechten Seite der Abbildung gezeigt. Der "footprint"-Bereich ist durch die solide Linie dargestellt. Die Sequenz der "CACCC"-Box und der mutierten Oktamer-Homologie ist als doppelsträngiger Bereich zu erkennen.

Kpn I-Fragment aus p111/7SK5'+3' integriert. Bei diesem Subklon ist also die Sequenz von Position -207 bis -111 durch prokaryote Vektorsequenz ersetzt worden, wobei im Vergleich mit dem Wildtyp 15 zusätzliche Basenpaare inseriert worden sind.

Der Subklon p7SK/SphpAT-130 entstand durch die Integration eines Sph I-Hinc II-Fragmentes aus pAT153 in den Vektor, der nach Restriktion des Plasmids p7SK5'+3'Oc2m mit Sph I und Eco RV erhalten wurde. In diesem Subklon ist die DNA-Sequenz stromabwärts der Sph I-Schnittstelle (ab Position -226) und der Position -130 durch pAT153-Sequenz ersetzt. Dadurch weist dieser Subklon im Vergleich zum Wildtyp eine Deletion von 7 bp zwischen dem "core"-Promotor und der distalen 5'-flankierenden Sequenz ab Position -227 auf.

Die Auswertung mehrerer Transfektionsexperimente mit diesen Subklonen (Abbildung 22B) zeigte, daß nur der Subklon p7SK/BsmpUC-111 eine erhöhte Expressionsrate von 26,5 % im Vergleich zum Konstrukt p111/7SK5'+3' aufwies. Im Gegensatz dazu wird der Subklon ohne "CACCC"-Homologie, p7SK/SphpAT-130, genau wie der -111-Deletionsklon in-vivo kaum exprimiert.

Diese Ergebnisse unterstützen die oben gemachte Aussage, daß die funktionelle DSE-Sequenz sich von Position -231 bis -207 erstreckt, und machen die Beteiligung der "CACCC"-Box sehr wahrscheinlich.

Die Reduktion der Expression des Konstrukts p7SK/BsmpUC-111 auf 26,5 %, verglichen mit dem Wildtyp, ist einmal mit dem etwas zu großen Abstand des DSE-Elements vom "core"-Promotor zu erklären, vor allem aber auch mit der falschen Topologie dieser beiden Sequenz-Elemente zueinander. Bedingt durch die 15 bp Insertion, befindet sich das DSE genau auf der gegenüberliegenden DNA-Seite, verglichen zum Wildtyp. Diese Erklärungsmöglichkeiten werden durch die stark reduzierte Expressionsrate von Subklonen, die zwischen DSE und "core"-Promotor verschieden lange Insertionen bzw. Deletionen zeigen, gestützt. So ist die Expressionsrate des Subklones penh5'a auf 23,1 % reduziert. Er enthält eine Insertion von 69 bp zwischen DSE und "core-Promotor". Insertion noch größerer DNA-Fragmente führt zu Konstrukten, deren in-vivo Transkriptionsrate mit der des Subklons p111/7SK5'+3' zu vergleichen ist (Daten nicht gezeigt).

5. Diskussion

In den letzten Jahren hat die Analyse der Regulation der Transkription niedermolekularer RNA Spezies durch die RNA Polymerase III großes Interesse erfahren. Durch die Isolierung einer ganzen Reihe von Pol III-Genen und die Studien ihrer in-vitro und in-vivo Expression wurden einige fundamentale Merkmale des RNA Polymerase III Transkriptions-Systems aufgedeckt (21).

So ist die Transkription der zuerst analysierten Gene, 5S rRNA und tRNA Gene verschiedener Spezies, von geninternen Promotorsequenzen abhängig (21). Die Expression dieser Gene kann aber noch sowohl von 5'- als auch von 3'-flankierenden Sequenzen moduliert werden (53).

Der geninterne Promotor der tRNA Gene ist in zwei distinkte Bereiche, die "A-" und die "B-Box", unterteilt ("split"-Promotor). Die 5S rRNA Gene zeigen eine zusammenhängende interne Kontrollregion (ICR), die in drei ineinander übergehende Bereiche, die "A-Box", die "C-Box" und das intermediäre Element, unterteilt werden kann. So scheint die "A-Box" ein allgemeines Sequenz-Element dieser Gene zu sein, während die "B-" bzw. "C-Box" als genspezifisch anzusehen sind (21).

Ein ähnliches Bild ergab sich für die an der Transkription beteiligten Protein-Faktoren. Zusätzlich zu dem für das 5S RNA Gen spezifischen Faktor, TF III A, wurden zwei allgemeine Pol III Transkriptionsfaktoren, TF III B und TF III C, beschrieben. Sowohl die "A-Box" als auch die "B-Box" beeinflussen die Bindung des TF III C an die Pol III-Gene, dessen Bindung für die Interaktion des Proteins TF III B mit dem Transkriptionskomplex essentiell ist; TF III B zeigt selbst keine DNA-Bindung (21). Allgemeine und genspezifische DNA-Sequenz-Elemente in Zusammenarbeit mit allgemeinen und genspezifischen Faktoren sind also gemeinsam für die Regulation der Expression der Pol III-Gene verantwortlich.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der in-vitro und in-vivo Expression der beiden menschlichen 7S RNA Gene (7S K und 7S L).

Die Sequenz des 7S K Gens zeigt von Position -9 bis +18 eine Homologie zur "A-Box" und im Bereich +49 bis +58 eine Homologie zur "B-Box", was auf einen geninternen Promotor des tRNA Typs hindeutete (71). Da die Konsensus-Sequenzen aber mehrere divergente Basen zulassen ("A-Box" : TRGCNNAGY_GG, "B-Box" : GGTTTCGANTCC), ist die Identifizierung dieser Elemente im 7S K Gen nicht eindeutig.

Analysen von Krüger und Benecke (71) und Murphy et al. (73) hatten gezeigt, daß die in-vitro Transkription des 7S K Gens von dem Vorhandensein der 5'-flankierenden Sequenz abhängt mit essentiellen Sequenz-Elementen bei Position -60 und -25.

Der Versuch, die geninternen Promotorelemente des 7S K RNA Gens mit Hilfe der in-vitro Transkription von Deletionsmutanten zu analysieren (Abbildung 1 und 2) zeigte, daß das 7S K Gen keine geninternen, zur Expression wichtigen DNA-Sequenzen aufweist. Alle zur in-vitro Transkription eingesetzten Konstrukte wurden effizient expremiert. Sowohl die Deletion der "A-Box"-Homologie (Konstrukt p7SK dS1/S3) als auch der "A-" und der "B-Box"-Homologie (Subklon p7SK dS1/S3MB) hatte keine Auswirkung auf die Effizienz der Transkription.

Zur Absicherung dieser Daten wurden Konstrukte erzeugt, bei denen der überwiegende Teil der 7S K Gensequenz durch prokaryote Vektorsequenzen ersetzt wurde (Abbildung 3). Die in-vitro Transkription mit diesen Subklonen als Matrize (Abbildung 4) zeigte, daß auch sie effizient expremiert werden.

Das 7S K Gen zeigt also einen rein genexternen Promotor, der in der 5'-flankierenden Sequenz zu finden ist. Bei der in-vitro Transkription stellt die 5'-flankierende Sequenz bis Position -67 den Promotor dar (71,73,107). Wie in-vivo Studien zeigten (siehe unten), ist auch in-vivo der 7S K Genpromotor rein genextern in der 5'-flankierenden Sequenz angesiedelt (107).

Das 7S K Gen stellt einen Extremfall im Bereich der RNA Polymerase III katalysierten RNA Synthese dar, da bei diesem Gen keine geninternen Promotorsequenzen zu finden sind. Eine ähnliche Promotorstruktur zeigt das U₆ snRNA Gen verschiedener Spezies (21,22,28,55,56), das, wie parallele Studien belegen, auch einen rein genexternen, in der 5'-flankierenden Sequenz liegenden Promotor aufweist, der die Expression des Gens in-vitro und in-vivo steuert.

Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob die allgemeinen Faktoren TF III B und TF III C bei der Transkription des 7S K Gens ebenfalls eine Funktion haben. Erste Studien mit aufgereinigten Faktoren zeigen, daß zur in-vitro Transkription des 7S K Gens Faktor-Kombinationen benötigt werden, die so vorher nicht beschrieben worden sind, wobei ein genspezifischer Faktor, der TF III K, zu identifizieren ist (118).

Die Analyse der 5'-flankierenden Sequenz des 7S K Gens (Abbildung 16) zeigt die Existenz einer "TATA"-Box-Homologie im Bereich der Position -25

an. Wird diese "TATA"-Box entfernt und durch prokaryote Vektorsequenz ersetzt, so zeigt das Konstrukt (p7SKd38, Abbildung 5) keine in-vitro Exprimierbarkeit mehr (Abbildung 6). Dagegen wird das Konstrukt p7SKd23 (Abbildung 5), bei dem die Sequenz zwischen "TATA"-Box-Homologie und 5'-flankierender Sequenz bis Position -9 durch Vektorsequenzen ersetzt wurde, in-vitro exprimiert, wenn auch etwas reduziert (Abbildung 6). Die Reduktion der Transkriptionsrate bei dem Subklon p7SKd23 erklärt sich vielleicht aus dem falschen Abstand der "TATA"-Box vom Genbeginn. Experimente von Murphy et al. (73), bei denen die "TATA"-Box spezifisch mutiert wurde, zeigten, daß die erhaltenen Konstrukte in-vitro nicht transkribiert werden.

Der 7S K Promotor weist demnach eine "TATA"-Box auf, die für die Expression essentiell ist. Auch in der 5'-flankierenden Sequenz des U₆ snRNA Gens findet sich eine solche "TATA"-Box. Dieses bei den "core"-Promotoren der Pol II-Gene beschriebene Element ist auch beim U₆ snRNA Gen für die Transkription durch die RNA Polymerase III notwendig (17,57). Neuere Studien (57) haben gezeigt, daß das U₆ snRNA Gen aus *Xenopus* auch von der RNA Polymerase II transkribiert werden kann, wobei zu lange und nicht korrekt terminierte Transkripte entstehen. Wird zusätzlich die "TATA"-Box des U₆ Genpromotors entfernt, so wird das Gen nur noch von der RNA Polymerase II transkribiert. Ersetzt man dagegen anders herum die DSE- und die PSE-Sequenz des U₆ Genpromotors durch die homologen Sequenzen des U₂ snRNA Gens (Pol II-Gen) und läßt die "TATA"-Box bestehen, so wird das erhaltene Konstrukt von der RNA Polymerase III transkribiert. Die "TATA"-Box, ein Promotor-Bestandteil des RNA Polymerase II-Systems, selektiert also in diesem Fall auf die Transkription durch die RNA Polymerase III. Dieser sehr erstaunliche Befund, daß ein klassisches Sequenz-Element des Pol II-Systems für die Transkription durch die RNA Polymerase III notwendig ist, wirft die Frage auf, inwieweit die Transkriptionssysteme des eukaryoten Zellkerns miteinander verbunden sind und ob vielleicht gemeinsame Faktoren und Sequenzen benutzt werden. Es stellt sich also z.B. die Frage, ob die "TATA"-Box des 7S K Promotors (bzw. des U₆ Promotors) von dem gleichen Faktor erkannt wird, der auch die "TATA"-Box der Pol II-Promotoren erkennt. Nach neueren Ergebnissen (119) sind die, die "TATA"-Box erkennenden Faktoren, in mindestens zwei Klassen einzuteilen. Somit ist wahrscheinlich, daß für die "TATA"-Box des 7S K und des U₆ snRNA Gens wiederum ein zusätzlicher "TATA"-Faktor existiert.

Die Analyse des Startpunktes der Transkription bei der in-vitro Expression der 7S K-pAT-Konstrukte (p7SK5'+3', pAT 5'7SK und p7SK5'+3'Maxi, Abbildung 4) zeigte, daß als Initiationsnukleotid der erste G-Rest der Vektorsequenz fungiert, der in Bezug zum Wildtyp die Position -2 einnimmt. Die Analyse der DNA-Sequenz des Subklons p7SK5'+3' im Bereich der Initiation zeigt, daß jedoch auch an Position +1 ein G-Rest vorhanden ist (Abbildung 8). Die Experimente zur in-vitro und in-vivo Expression der Konstrukte p7SK5'+3'd K/C und p7SK5'+3'd A/C (Abbildungen 7 und 8) weisen darauf hin, daß auch die Struktur der Initiationsregion für die Expression des 7S K Gens eine wichtige Funktion hat. Während im Wildtyp die Sequenz CCTCGGA im Initiationsbereich zu finden ist, zeigen die in-vitro und in-vivo exprimierten Konstrukte p7SK5'+3' bzw. p7SK5'+3'd A/C die Sequenz CCGAG bzw. CCGAT in diesem Bereich. Diese Folge von 4 bzw. 2 Pyrimidinen vor dem Initiations-G ist in der entsprechenden Sequenz des Konstrukts p7SK5'+3'd K/C nicht zu finden, das weder in-vivo noch in-vitro transkribiert wird.

In ähnlichen Studien mit anderen Pol II- oder Pol III-Genen zeigte die Veränderung der Initiationsregion nur einen leichten Einfluß auf die Effektivität der Transkription (120,121,122).

Bei Studien zur Analyse der Abhängigkeit der Transkription des Xenopus U₆ snRNA Gens von der Struktur der Initiationsregion zeigte es sich, daß in diesem Fall auch eine starke Abhängigkeit der Expressionsrate von der Sequenz direkt am Genbeginn besteht (57). Auch bei diesem Gen führte die Mutation des Initiationsnukleotids, ein G-Rest, zur Inaktivierung des Gens; aber auch die Veränderung der unmittelbar benachbarten Sequenz (TCGT im Wildtyp) führten zu einer starken Beeinflussung der Genaktivität. Die starke Abhängigkeit der Transkription des U₆ snRNA Gens von der Sequenz direkt am Genbeginn lassen Mattaj et al. (57) vermuten, daß ein minimaler Abstand zwischen der Initiationsstelle und den weiteren stromaufwärts liegenden Promotor-Elementen vorhanden sein muß. Weiter vermuten die Autoren, daß ein spezifischer Faktor oder die RNA Polymerase III selbst für die direkte Selektion der Initiationsstelle verantwortlich ist.

Die Analysen zur Initiationsregion geben auch eine Erklärung für die etwas reduzierte Expressionsrate des Subklons p7SK5'+3' im Vergleich mit dem Wildtyp-Konstrukt p7SK/DE. Auch bei diesem Konstrukt ist die Initiationsregion schon etwas verändert worden.

Die zur in-vitro Transkription des 7S K Gens benötigte 5'-flankierende Sequenz erstreckt sich also von Position -67 bis zum Genbeginn; dabei sind drei Elemente zu unterscheiden:

die Struktur der Initiationsregion, die "TATA"-Box bei Position -25 und die Sequenz um Position -67, die eine recht hohe Homologie zu der PSE-Sequenz der U snRNA Gene zeigt (22).

Parallel zu den Studien zur Expression des 7S K Gens wurden in der vorliegenden Arbeit auch Studien zur Expression des 7S L Gens unternommen.

Ullu und Weiner hatten 1985 gezeigt, daß die Transkription des 7S L RNA Gens von der 5'-flankierenden Sequenz des Gens abhängig ist (52).

Es sollte nun untersucht werden, ob die 5'-flankierenden Sequenzen der beiden 7S RNA Gene untereinander austauschbar sind, d.h., ob z.B. die 5'-flankierende Sequenz des 7S L Gens mit der Gensequenz des 7S K Gens so interagieren kann, daß die entstehenden Hybrid-Konstrukte in-vitro transkribiert werden.

Diese Analysen zeigten, daß das Hybrid-Konstrukt pUC8 5'K-LG (Abbildung 10) effizient in-vitro exprimiert wird (108).

Das reziproke Konstrukt pAT 5'L-KG war (Abbildung 11C) dagegen nicht in der Lage, eine effiziente und korrekte in-vitro Transkription durch die RNA Polymerase III zu steuern. Dieses negative Ergebnis resultierte nicht aus einem falschen Abstand der 5'-flankierenden Sequenz des 7S L Gens zu der 7S K Gensequenz, da das Konstrukt pUC8 5'L-LG mit 18 bp Insertion zwischen 5'-flankierender und 7S L Gensequenz in-vitro exprimiert wurde, wenn auch mit reduzierter Effektivität (108).

Diese Ergebnisse belegten darüber hinaus, daß die Regulation der Expression der beiden 7S RNA Gene unterschiedlich verläuft. Während das 7S K Gen einen rein genexternen Promotor aufweist, besitzt der Promotor des 7S L Gens einen geninternen und einen genexternen Anteil. Damit enthält das 7S L Gen also auch eine Art von "split"-Promotor.

Zur Eingrenzung der geninternen Promotorsequenz des 7S L Gens wurde eine Reihe von Konstrukten erzeugt, die entweder durch Deletion geninterner Sequenzen oder durch Substitution von Gensequenzen durch Vektorsequenzen entstanden. Die in-vitro Transkription mit diesen Konstrukten als Matrize (Abbildung 13) ergab zusammen mit der Analyse ihrer Sequenz im Bereich der Initiation folgendes Bild:

Das letzte in-vitro exprimierbare Deletionskonstrukt zeigt die Gensequenz bis Position +18 fusioniert mit dem 3'-Teil des Gens ab Position +145.

Der Vergleich der Sequenz des ersten nicht exprimierten Konstrukts p7SL/+11/+145 mit der des Konstrukts p7SL/+18/+145 zeigt, daß diese beiden Konstrukte sich im wichtigen Bereich bis +18 nur an zwei Positionen unterscheiden, dem T- bzw. G-Rest an Position +12 und dem C- bzw. A-Rest bei +15.

Die Mutation des T-Restes an Position +12 scheint nicht zur Inaktivierung des Konstruktes p7SL/+11/+145 zu führen, da andere Konstrukte mit dieser Veränderung dennoch in-vitro exprimiert werden, wie die Konstrukte p7SL/del A-Box und pUC8 5'L(+7)pAT/C zeigen. Die Möglichkeit, daß ein T->G Austausch nicht, ein T->A Austausch jedoch toleriert wird, ist nicht ganz auszuschließen. Diese Erklärung ist jedoch unwahrscheinlich, da bei den Konstrukten mit T->A Austausch auch die unmittelbar umgebende Sequenz zusätzlich sehr stark von der des Wildtyps abweicht, was einen stärkeren Einfluß haben sollte. Bei dem Konstrukt p7SL/+11/+145 jedoch stimmen die Randsequenzen mit denen des Wildtyps überein.

Der C-Rest und der G-Rest an Position +15 bzw. +16 scheinen dagegen essentielle Promotorbestandteile darzustellen. Nur Konstrukte mit dieser Sequenz an Position +15/+16 werden in-vitro exprimiert. Weder der C-Rest an Position +15 (pUC8 5'L(+7)pAT/E) noch der G-Rest an Position +16 (pAT 5'L-KG) allein führen zu in-vitro exprimierten Konstrukten.

Die starke Reduktion der Expression des Konstrukts pUC8 5'L(+7)pAT/C im Vergleich mit dem Konstrukt p7SL/del A-Box ist durch die Sequenz GCTTTAAGCGG im Initiationsbereich dieses Konstrukts zu erklären. Diese Sequenz ähnelt der Terminations-Sequenz des RNA Polymerase III-Systems (vier T-Reste in einer GC-reichen Umgebung).

Die Ergebnisse zur Bedeutung der CG-Reste an Position +15/+16 als essentiellen Promotorbestandteil werden durch die S₁-Analyse der in-vitro Transkription mit den Subklonen pUC8 5'L(+22)pAT/E, pUC8 5'L(+7)pAT/E und pUC8 5'L(+7)pAT/C (Abbildung 14) erhärtet. Selbst in der im Bereich der Initiations-Region sehr stark divergenten Sequenz des Subklons pUC8 5'L(+7)pAT/C ermöglichen diese CG-Reste an Position +15/+16 noch eine deutliche Expression.

Von Sebastian Bredow parallel durchgeführte Experimente mit Hilfe der Methode des DNase I-Verdauungsschutzes bestätigten die oben gezeigten Daten. S100-Extraktproteine aus HeLa-Zellen schützen den Bereich von -3 bis +16 des 7S L Gens vor der Verdauung durch die DNase I. Dieser Bereich stellt also eine Bindungsstelle für einen Proteinfaktor dar, der, wie Experimente von S. Bredow zeigten, in einer Phosphocellulose-Fraktion

des S100-Extrakts enthalten ist, die für die in-vitro Transkription des 7S L Gens mit benötigt wird (Bredow et al. eingereicht).

Alle diese Daten ergeben für die Promotorstruktur des 7S L Gens folgendes Bild:

Das 7S L Gen zeigt einen geteilten Promotor, der aus einem genexternen Anteil bis etwa zur Position -40 (57) und einem geninternen Anteil (bis zur Position +18) besteht.

Das Vorhandensein der Sequenz CG an Position +15/+16 ist für die in-vitro Expression des 7S L RNA Gens notwendig.

In Anbetracht des Wissens über die eukaryoten Promotorstrukturen ist ersichtlich, daß die Sequenz CG allein nicht den geninternen Promotor darstellen kann, vielmehr ist diese Sequenz ein wichtiger Bestandteil des Promotors.

Durch weitere Analysen der Expression des 7S L Gens in-vitro und in-vivo sollte es möglich sein, die genexternen und geninternen Promotor-Sequenzen des 7S L RNA Gens genau einzugrenzen.

Da einige Regulationsmechanismen in-vitro nicht zu analysieren sind (so z.B. oftmals die "enhancer"-Wirkung), wurde in der vorliegenden Arbeit auch die in-vivo Expression des 7S K Gens analysiert.

Die in-vitro Analyse hatte gezeigt, daß die 5'-flankierende Sequenz des 7S K Gens bis Position -67 den Promotor des Gens darstellt (71,73,107). Um diese Daten zu überprüfen, wurden das Konstrukt p7SK5'+3' (5'-flankierende Sequenz bis -242) und das Konstrukt p111/7SK5'+3' (5'-flankierende Sequenz bis -111) in HeLa-Zellen transfektiert. Die Si-Analyse der totalzellulären RNA aus diesen Zellen im Vergleich mit der der Transkripte der in-vitro Transkription mit diesen Subklonen (Abbildung 15) zeigte deutlich, daß der Subklon p111/7SK5'+3' in-vivo eine sehr geringe Expressionsrate (6,2 %) im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt p7SK5'+3' besitzt. In-vitro jedoch ist die Expressionsrate der beiden Konstrukte miteinander durchaus zu vergleichen.

Dieser Vergleich bewies, daß der 7S K "core"-Promotor allein in-vivo nicht in der Lage ist, eine effektive Transkription zu steuern. Zur effektiven Expression in intakten Zellen sind also weitere 5'-flankierende Sequenzen

notwendig, die zwischen -111 und -242 stromaufwärts vom 7S K Gen zu finden sein müssen.

Diese Kombination eines proximalen und distalen Promotor-Elements für die Expression ist bei den 7S RNA Genen so noch nicht beschrieben worden. Bekannt ist dieses Phänomen aus den Untersuchungen der Expression der U snRNA Gene.

Die genaue Analyse der flankierenden Sequenz des 7S K Gens im Bereich der Position -242 bis -111 (Abbildung 16) zeigt mehrere Sequenz-Elemente auf, die auch in anderen Promotor/"enhancer"-Sequenzen zu finden sind.

Im Bereich der Positionen -233 (distal) und -129 (proximal) findet sich eine Sequenz, die zu der Oktamer-Sequenz verschiedener "enhancer"-Sequenzen (ATTGTCAT) homolog ist. Dieses Oktamer-Motiv ist, wie in parallelen Studien gezeigt wurde, Bestandteil der DSE-Sequenz des U₆ snRNA Gens mehrerer Spezies und ist bei diesem Gen für dessen in-vivo Expression essentiell (17,21,28,55-57). Die analogen DSE-Sequenzen der U₁ und U₂ snRNA Gene zeigen "enhancer"-Wirkung (17), und das DSE-Element des U₂ snRNA Gens kann das des U₆ Gens funktional ersetzen (56).

In beiden Oktamer-Homologien des 7S K Gens findet sich ein Baseneinschub in die Konsensus-Sequenz (distale Homologie : ATTTAGCAT, proximale Homologie : ATTTGCTAT).

Murphy et al. (73) vermuten eine ähnliche Funktion dieser Oktamer-Homologien im 7S K Promotor wie beim U₆ Promotor. Ihre Hypothese wurde durch die in-vitro Transkription mit Deletionsmutanten gestützt, die zeigten, daß ein Konstrukt mit 5'-flankierender Sequenz bis zur Position -154 nur noch 63 % Aktivität aufweist (73). Weiterhin stimuliert aufgereinigter OTF-1 Faktor, der für die Transkription des Histon H2B Gens wichtig ist (123), die in-vitro Transkription des 7S K Gens durch RNA Polymerase III (22). Dieser OTF-1 Faktor bindet an das Oktamer-Motiv des Histon H2B Gens und stimuliert so dessen Expression. Die Ergebnisse der in-vitro Transkription mit verschiedenen Deletionsmutanten, die sowohl von Krüger und Benecke (71) als auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit unternommen wurden (siehe Abbildung 15), zeigten, daß die Oktamer-Homologien für die in-vitro Transkription des 7S K Gens keine Bedeutung haben. Wie oben dargestellt, wird der -111 Deletionsklon, dem beide Oktamer-Homologien fehlen, in-vitro mindestens genauso aktiv transkribiert wie das Wildtyp-Promotor-Konstrukt. Der Grund für die Diskrepanz dieser Daten ist nicht klar. Die Reinigung der für die Transkription des 7S K Gens notwendigen Faktoren wird zeigen, ob einer dieser Faktoren mit

OTF-1 identisch ist. In diesem Fall muß man eine relativ relaxierte Bindungs-Spezifität für OTF-1 postulieren, da beide Oktamer-Homologien eine Insertion eines Basenpaares aufweisen, die im Falle der distalen Homologie das Sequenz-Element genau in der Mitte teilt. Dadurch ist die Struktur der Sequenz vermutlich weitaus stärker verändert, als wenn am Rand der Homologie ein Basenaustausch zu finden ist, wie es der Fall des Oktamer-Motivs der SV40-"enhancer"-Sequenz (CTTTGCAT,37) zeigt.

Direkt benachbart zur distalen Oktamer-Homologie findet sich in der 5'-flankierenden Sequenz des 7S K Gens bei der Position -229 eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Sph I. Diese Schnittstelle bildet mit den direkt benachbarten Sequenzen ebenfalls eine Homologie mit der Sph I-Box, wie sie aus der SV40 "enhancer"-Sequenz (37, SV40 : AAGCATGCA, 7S K : TAGCATGCC,) bekannt ist.

Stromabwärts der Sph I-Schnittstelle findet sich bei Position -222 die Sequenz GCCCCACCC, die der "CACCC"-Box des β -Globin Gens (111) und des Tryptophan Oxygenase (TO) Gens (GCCACACCC;112,113) homolog ist. Diese "CACCC"-Box ist beim β -Globin Gens ist für dessen Expression notwendig (111). Die "CACCC"-Box stromaufwärts der Glucocorticoid Rezeptor Bindungsstelle des TO Gens ist für die Induktion der Transkription des Gens durch Steroid-Hormone notwendig (124). Dieses Sequenz-Element ist in der Lage, mit der Glucocorticoid Rezeptor Bindungsstelle des MMTV-Virus synergistisch zu kooperieren (113). Mit einer Periodizität von etwa 10 bp scheint diese Interaktion vom korrekten Abstand der beiden Sequenz-Elemente zueinander abzuhängen.

Es war naheliegend, anzunehmen, daß die aktivierende Funktion der distalen flankierenden Sequenz des 7S K Gens auf der Wirkung eines der oben beschriebenen Sequenz-Elemente beruht.

Bei der ähnlichen Struktur der Promotoren des 7S K Gens und des U6 snRNA Gens (beide zeigen eine "TATA"-Box, eine zueinander homologe PSE-Sequenz im Bereich der Position -60 und Oktamer-Homologien) war es weiterhin naheliegend anzunehmen, daß auch im 7S K Gen die aktivierende Wirkung der distalen 5'-flankierenden Sequenz auf die Oktamer-Homologien zurückzuführen sei.

Daher wurde zuerst die "enhancer"-Funktion der 5'-flankierenden Sequenz des 7S K Gens von Position -242 bis -60 auf seinen eigenen

"core"-Promotor, aber auch auf einen Pol II-Promotor, der aus dem SV40 Virus stammt, untersucht.

Beide Analysen (Abbildungen 17,18,19) zeigten eindeutig, daß die 5'-flankierende Sequenz nicht als "enhancer" im klassischen Sinn wirkt.

Zur Eingrenzung des zur effizienten *in-vivo* Expression notwendigen distalen, stimulierenden Sequenz-Elementes (DSE) des 7S K Promotors und zur Überprüfung der Funktionalität der Oktamer-Homologien wurden Deletionsklone und Konstrukte mit Mutationen der Oktamer-Homologien erzeugt. Abschließend wurden noch zwei Substitutions-Klone konstruiert, bei denen entweder die Sequenz von -226 bis -130 (p7SK/SphpAT-130, 7 bp Deletion) oder die zwischen den Positionen -207 bis -111 (15 bp Insertion, p7SK/BsmpUC-111) durch Vektorsequenz ersetzt wurde. Beide Subklone unterscheiden sich also durch die Präsenz der "CACCC"-Box.

Die Analyse der *in-vivo* Expressionsrate dieser Konstrukte (Abbildungen 20,21,22) zeigte, daß keine der Oktamer-Homologien für die *in-vivo* Expression des 7S K Gens benötigt wird.

Die für die Stimulierung der Expression notwendige Sequenz findet sich in dem Bereich der Positionen -231 bis -207. In diesem Sequenz-Bereich liegt die "CACCC"-Box-Homologie.

Nur bei korrekter Orientierung und im korrekten Abstand ermöglicht das distale Sequenz-Element aus der 5'-flankierenden Sequenz die Aktivierung des "core"-Promotors.

Parallel von S. Bredow durchgeführte DNase I "footprint" Experimente zeigten, daß Kern-Extrakt-Protein aus HeLa-Zellen tatsächlich den Bereich von -229 bis -215 der 5'-flankierenden Sequenz des 7S K Gens vor der Verdauung durch die DNase I schützt. Dieser "footprint" liegt also genau über der "CACCC"-Box-Homologie.

Die Interaktion des an das DSE bindenden Faktors mit den an den "core"-Promotor bindenden Faktoren scheint stark von der topologischen Lage der Bindungssequenzen zueinander abhängig zu sein. Weiterhin führen schon Veränderungen in der Randsequenz des Bindungsbereichs im DSE wahrscheinlich zu einer Beeinflussung der DNA-Protein Wechselwirkung, wodurch die Expressionsaktivität verändert wird (siehe die Expression der Subklone p7SK5'+3'Oc1m, p231/7SK5'+3', p226/7SK5'+3').

Der 7S K Promotor zeigt also vier wichtige Sequenzelemente, die zur Expression des Gens notwendig sind. Die Initiationsregion und die "TATA"-

Box-Homologie bildet zusammen mit der -60-Region, der PSE-Sequenz, den "core"-Promotor, der für die in-vitro Transkription des Gens völlig ausreichend ist. Bei der in-vivo Expression ist zusätzlich noch das DSE-Element bei Position -220 notwendig. Dieses DSE-Element ist nur im richtigen Abstand und in der richtigen Orientierung in Bezug auf den "core"-Promotor in der Lage, diesen zu aktivieren, und ist somit kein klassischer "enhancer".

Nähere Analysen müssen zeigen, ob der an die "CACCC"-Box des 7S K Gens bindende Faktor homolog zu dem Faktor ist, der an die "CACCC"-Box des β -Globin bzw. des Tryptophan Oxygenase (TO Gen) bindet. Für den "CACCC"-Faktor des TO Gens wurde, wie oben gesagt, eine ähnliche Abhängigkeit seiner Funktionalität von der topologischen Lage der Bindungsstelle beschrieben, wie es sich beim 7S K Gen gezeigt hat.

Der Sequenz-Vergleich zwischen dem 7S K Promotor und dem U₆ Promotor läßt eine sehr ähnliche Regulation beider Gene vermuten (22); beide Promotoren zeigen eine "TATA"-Box bei Position -25, ein PSE-Element bei -60 und Oktamer-Homologien bei -220. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellte Analyse zeigt aber deutlich, daß beide Gene unterschiedliche Sequenzen und Faktoren zur in-vivo Expression benötigen. Weiterhin zeigt die Identifizierung der "CACCC"-Box als putativem DSE-Bestandteil des 7S K Promotors eine weitere Verbindung zwischen dem Pol III- und dem Pol II-System auf. Im Gegensatz zu den bisher dargestellten, von beiden Polymerase Systemen genutzten Sequenz-Elementen ("TATA"-Box, PSE, DSE), die meist aus dem Bereich der U snRNA Transkription stammen, wird hier ein Element beschrieben, das in einer nicht so speziellen Klasse der Pol II-Gene auftritt. Die weitere Analyse der zur Transkription verschiedener Pol III-Gene notwendigen Sequenzen und Faktoren wird zeigen, ob noch mehr Verbindungen bestehen. So scheint die durch Sequenzvergleich identifizierte ATF-Bindungsstelle im genexternen Anteil des 7S L Promotors eine funktionale Bedeutung zu haben (Bredow et al. in Vorbereitung), ähnlich wie die Spi- und die ATF-Bindungsstelle im 5'-flankierenden Bereich der von der RNA Polymerase III transkribierten Gene für die EBER RNAs (125).

Betrachtet man die evolutionäre Konservierung der Struktur der RNA Polymerasen (21), so ist es vielleicht nicht mehr so verwunderlich, daß RNA Polymerase II und III gemeinsame Mechanismen zur Erkennung ihrer Promotoren nutzen. Auch die Mechanismen zur Erkennung der Promotoren

und zur Initiation der Transkription scheinen sehr konservativ zu sein. So kann der humane Östrogen Rezeptor als Hormon-abhängiger Transkriptionsaktivator in Hefe fungieren (126), und der Trans-Aktivator GAL4 aus Hefe ist in der Lage, in menschlichen Zellen die Transkription verschiedener Gene zu aktivieren, wenn die GAL4 Bindungsstelle in die Promotoren der Test-Konstrukte integriert worden ist (127).

Die weitere Analyse der bei der Transkription der 7S RNA Gene notwendigen Faktoren wird zeigen, ob diese Proteine in die bisher definierten Klassen der Transkriptionsfaktoren eingeordnet werden können. Neben der Frage nach dem DNA-Bindungsmotiv (z.B. "helix-turn-helix" oder Zink-Finger) ist auch die Analyse der Protein-Protein Wechselwirkungen (amphipathische Aktivierungs-Helix der Transkriptionsfaktoren) wichtig.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die zur in-vitro und in-vivo Transkription der beiden menschlichen 7S RNA Gene notwendigen Promotor-Sequenzen analysiert.

Im Gegensatz zu den meisten durch die RNA Polymerase III transkribierten Genen (Pol III-Gene) zeigt das 7S K RNA Gen keinen geninternen Promotor. Vielmehr findet sich der Promotor des 7S K Gens ausschließlich in der 5'-flankierenden Sequenz des Gens, ist also rein genextern.

Während bei der in-vitro Transkription die 5'-flankierende Sequenz bis zur Position -67 vollständig zur korrekten und effizienten Expression des Gens ausreicht, erstreckt sich der für die in-vivo Expression benötigte Sequenzbereich weiter in Richtung stromaufwärts bis zur Position -231.

Der 7S K Promotor läßt sich in vier wichtige Sequenz-Elemente unterteilen, von denen die ersten drei Elemente den für die in-vitro Expression völlig ausreichenden "core"-Promotor bilden:

Die Struktur der Initiationsregion ist für die Expression des Gens von entscheidender Bedeutung. Neben dem anscheinend wichtigen G-Rest als Initiationsnukleotid haben auch die unmittelbar benachbarten Sequenzen einen starken Einfluß auf die Expression des Gens.

Die "TATA"-Box bei Position -25 hat eine entscheidende Bedeutung für die Transkription des 7S K Gens durch die RNA Polymerase III.

Die DNA-Sequenz um den Bereich der Position -60, die eine hohe Homologie zu den PSE-Sequenzen der U snRNA Gene zeigt, ist ebenfalls wichtiger Bestandteil des "core"-Promotors.

Zur effizienten in-vivo Expression des 7S K Gens ist die Sequenz zwischen den Positionen -207 und -231 zusätzlich erforderlich. Jedoch nur bei korrekter Orientierung und in korrektem Abstand zum "core"-Promotor ist dieses distale, stimulierende Sequenz-Element (DSE) in der Lage, die effiziente in-vivo Expression des 7S K Gens zu ermöglichen. In dieser DSE-Sequenz findet sich eine "CACCC"-Box-Homologie, die zusammen mit Randsequenzen in einem DNase I "footprint" zu finden ist, der mit Kern-Extrakt Protein aus HeLa-Zellen erhalten wurde.

Im Gegensatz zum 7S K Gen zeigt das 7S L RNA Gen einen "split"-Promotor mit einem genexternen, in der 5'-flankierenden Sequenz liegenden Anteil und einem geninternen Anteil, der sich bis zur Position +18 erstreckt. Die Sequenz CG an Position +15/+16 ist wichtiger Bestandteil die-

ses geninternen Promotor-Elements. Diese Sequenz ist dabei nicht mehr Bestandteil der "A-Box"-Homologie (+4 bis +14) dieses Gens.

DNase I "footprint"-Experimente mit S100-Extrakt Protein zeigen den Schutz der Sequenz im Bereich der Positionen -3 bis +16 vor der Verdauung durch die DNase I an.

Der Abstand zwischen dem geninternen und dem genexternen Promotor-Anteil des 7S L Gens ist anscheinend nicht absolut fixiert, da ein Konstrukt mit einer Insertion von 18 bp in diesem Bereich noch korrekt transkribiert wurde.

Zusammen belegen diese Daten, daß die beiden 7S RNA Gene untereinander eine unterschiedliche Regulation aufweisen und auch von den anderen bisher analysierten Pol III-Genen in dieser Hinsicht verschieden sind.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Dressler,G.R. und Gruss,P. (1988). Do multigene families regulate vertebrate development ? Trends Genet. 4, 214-219
- 2 Struhl,K. (1989). Helix-turn-helix,zinc-finger,and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins. Trends Biochem. Sci. 14, 137-140
- 3 Roeder,R.G. (1976). Eukaryotic nuclear RNA Polymerases. in RNA Polymerase, Losick,R und Chamberlin,M., Eds. 285-329 Cold Spring Harbor Laboratory. N.Y.
- 4 Roeder,R.G. (1974). Multiple forms of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerases in *Xenopus laevis*. J. Biol. Chem. 249, 241-248
- 5 Chambon,P. (1975). Eukaryotic nuclear RNA polymerases. Ann. Rev. Biochem. 44, 613-638
- 6 Jacob,S.T. (1985). RNA polymerases from higher eukaryotes. in Enzymes of Nucleic Acid Synthesis and Modification Volume II RNA Enzymes 44-49 CRC Press
- 7 Sollner-Webb,B. und Tower,J. (1986). Transcription of cloned eukaryotic ribosomal RNA genes. Ann. Rev. Biochem. 55, 801-830
- 8 Benecke,B.J. und Penman,S. (1977). A new class of small nuclear RNA molecules synthesized by a type I RNA polymerase in HeLa cells. Cell 12, 939-946
- 9 Zylber,E.A. und Penman,S. (1971). Products of RNA polymerases in HeLa cell nuclei. Proc. Nat. Acad Sci. USA 68, 2861-2865
- 10 Benecke,B.J. und Penman,S. (1979). Large species differences in the pattern of snPI RNA which can distinguish ape from human. J. Cell Biology 80, 778-783
- 11 Reichel,R.,Monstein,H.J.,Jansen,H.W.,Philipson,L. und Benecke,B.J. (1982). Small nuclear RNAs are encoded in the nontranscribed region of ribosomal spacer DNA. Proc. Nat. Acad Sci. USA 79, 3106-3110
- 12 Reichel,R. und Benecke,B.J. (1984). Localization of small nuclear polymerase I sequences at the 5' end of the human rDNA transcription unit. EMBO J. 3, 473-479
- 13 Reichel,R. (1983). Untersuchungen zur RNA-Polymerase I-katalysierten Biosynthese niedermolekularer Kern-RNA. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- 14 Kleinert,H. (1986). Untersuchungen zur in-vitro Transkription isolierter snPI-RNA-Gensequenzen mit lösliche Extrakten aus HeLa-Zellen. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum
- 15 Nevins,J.R. (1983). The pathway of eukaryotic mRNA formation. Ann. Rev. Biochem. 52, 441-383

- 16 Padgett,R.A.,Grabowski,P.J.,Konarska,M.M.,Seiler,S. und Sharp,P.A. (1986). Splicing of messenger RNA precursors. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 1119-1150
- 17 Parry,H.D.,Scherly,D. und Mattaj,I.W. (1989). "Snurpogenesis": The transcription and assembly of U snRNP components. *Trends Biochem. Sci.* 14, 15-19
- 18 Zieve,G. und Penman,S. (1976). Small RNA species of the HeLa cell: Metabolism and subcellular localization. *Cell* 8, 19-31
- 19 Zieve,G.,Benecke,B.J. und Penman,S. (1977). Synthesis of two classes of small RNA species in vivo and in vitro. *Biochemistry* 16, 4520-4525
- 20 Reichel,R. und Benecke,B.J. (1980). Reinitiation of synthesis of small cytoplasmic RNA species K and L in isolated HeLa cell nuclei in vitro. *Nucl. Acids Res.* 8, 225-234
- 21 Geiduschek,E.P. und Tocchini-Valentini,G.P. (1988). Transcription by RNA polymerase III. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 873-914
- 22 Murphy,S.,Moorefield,B. und Pieler,T. (1989). Common mechanisms of promoter recognition by RNA polymerases II and III. *Trends Genet.* 5, 122-126
- 23 Sollner-Webb,B. (1988). Surprises in polymerase III transcription. *Cell* 52, 153-154
- 24 Cozzarelli,N.R.,Gerrad,S.P.,Schlissel,M.,Brown,D.D. und Bogenhagen,D.F. (1983). Purified RNA polymerase III accurately and efficiently terminates transcription of 5S RNA genes. *Cell* 34, 829-835
- 25 Bogenhagen,D.F. und Brown,D.D. (1981). Nucleotide sequences in *Xenopus* 5S DNA required for transcriptional termination. *Cell* 24, 261-270
- 26 Weil,P.A.,Segall,J.,Harris,B.,Ng,S.Y. und Roeder,R.G. (1979). Faithful transcription of eukaryotic genes by RNA polymerase III in systems reconstituted with purified DNA templates. *J. Biol. Chem.* 254, 6163-6173
- 27 Shastry,B.S.,Ng,S.Y. und Roeder,R.G. (1982). Multiple factors involved in the transcription of class III genes in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 257, 12979-12986
- 28 Krol,A.,Charbon,P.,Ebel,J.P. und Appel,B. (1987). *Xenopus tropicalis* U6 snRNA genes transcribed by Pol III contain the upstream promoter elements used by Pol II dependent U snRNA genes. *Nucl. Acids Res.* 15, 2463-2478
- 29 Haltiner,M.M.,Smale,S.T. und Tjian,R.T. (1986). Two distinct promoter elements in the human rRNA gene identified by linker scanning mutagenesis. *Mol. Cell. Biol.* 6, 227-235

- 30 Maniatis,T.,Goodbourn,S. und Fischer,J.A. (1987). Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* 236, 1237-1245
- 31 Dynan,W.S. und Tjian,R.T. (1985). Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence specific DNA-binding proteins. *Nature* 316, 774-778
- 32 McKnight,S.L. und Tjian,R.T. (1986). Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* 46, 795-805
- 33 Dynan,S.W. (1986). Promoters for housekeeping genes. *Trends Genet.* 2, 196-197
- 34 Schaffner,W.,Serfling,E. und Jasin,M. (1985). Enhancer and eukaryotic gene transcription. *Trends Genet.* 1, 224-230
- 35 Herr,W. und Clarke,J. (1985). The SV40 enhancer is composed of multiple functional elements that can compensate fore one another. *Cell* 45, 461-475
- 36 Herr,W. und Gluzman,Y. (1985). Duplication of a mutated simian virus 40 enhancer restore its activity. *Nature* 313, 711-714
- 37 Ondek,B.,Gloss,L. und Herr,W. (1988). The SV40 enhancer contains two distinct levels of organization. *Nature* 333, 40-45
- 38 Sassone-Corsi,P. und Borrelli,E. (1986). Transcriptional regulation by *trans*-acting factors. *Trends Genet.* 2, 215-219
- 39 Bienz,M. und Pelham,H.R.B. (1986). The messenger RNA for alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster* differs in its 5'end in different developmental stages. *Cell* 33, 125-133
- 40 Serfling,E.,Lübbe,A.,Dorsch-Häsler,K. und Schaffner,W. (1985). Metal-dependent SV40 viruses containing inducible enhancers from the upstream region of metallothionein genes. *EMBO J.* 4, 3851-3859
- 41 Yamamoto,K.R. (1985). Steroid receptors regulated transcription of specific genes and gene networks. *Ann. Rev. Genet.* 19, 209-252
- 42 Beato,M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335-344
- 43 Gerster,T.,Matthias,P.,Thali,M.,Jiricny,J. und Schaffner,W. (1987). Cell type-specificity elements of the immunoglobulin heavy chain gene enhancer. *EMBO J.* 6, 1323-1330
- 44 Ares,M.,Mangin,M. und Weiner,A.M. (1985). Orientation dependent transcriptional activator upstream of a human U2 snRNA gene. *Mol. Cell. Biol.* 5, 1560-1570
- 45 Weller,P.,Bark,C.,Janson,L. und Pettersson, U. (1988). Transcriptional analysis of a human U4C gene: Involvement of transcription factors novel to snRNA gene expression. *Genes Dev.* 2, 1389-1399

- 46 Jones,N.C.,Rigby,P.W.J. und Ziff,E.B. (1988). Trans-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription: lessons from studies on DNA tumor viruses, *Genes Dev.* 2, 267-281
- 47 Robertson,M. (1988). Homoeo boxes, POU proteins and the limits of promiscuity. *Nature* 336, 522-524
- 48 Tanaka,M. Grossniklaus,U.,Herr,W. und Hernandez,N. (1988). Activation of the U2 snRNA promoter by the octamer motif defines a new class of RNA polymerase II enhancer elements. *Genes Dev.* 2, 1764-1778
- 49 Ptashne,M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335, 683-689
- 50 Ciliberto,G.,Raugei,G.,Costanzo,F.,Dente,L. und Cortese,R. (1983). Common and interchangeable elements in the promoters of genes transcribed by RNA polymerase III. *Cell* 32, 725-733
- 51 Ciliberto,G.,Castagnoli,L. und Cortese,R. (1983). Transcription by RNA polymerase III. *Curr. Topics Dev. Biol.* 18, 59-88
- 52 Ullu,E. und Weiner,A.M. (1985). Upstream sequences modulate the internal promoter of the human 7S L RNA gene. *Nature* 318, 371-374
- 53 Schaack,J.,Sharp,S.,Dingermann,T.,Burke,D.J.,Cooley,L. und Söll,D. (1984). The extent of a eukaryotic tRNA gene. *J. Biol. Chem.* 259, 1461-1467
- 54 Das,G.,Henning,D.,Wright,D. und Reddy,R. (1988). Upstream regulatory elements are necessary and sufficient for transcription of a U6 RNA gene by RNA polymerase III. *EMBO J.* 7, 503-512
- 55 Carbon,P.,Murgo,S.,Ebel,J.P.,Krol,A.,Tebb,G. und Mattaj,I.W. (1987). A common octamer motif binding protein is involved in the transcription of U6 snRNA by RNA polymerase III and U2 snRNA by RNA polymerase II. *Cell* 51, 71-79
- 56 Kunkel,G.R. und Pederson,T. (1988) Upstream elements required for the efficient transcription of a human U6 RNA gene resemble those of U1 and U2 genes even though a different polymerase is used. *Genes Dev.* 2, 196-204
- 57 Mattaj,I.A.,Dathan,N.A.,Parry,H.W.,Carbon,P. und Krol,A. (1988). Changing the RNA polymerase specificity of U snRNA gene promoters. *Cell* 55, 435-442
- 58 Segall,J.,Matsui,T. und Roeder,R.G. (1980). Multiple factors are required for the accurate transcription of purified genes by RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.* 255, 11986-11991
- 59 Lassar,A.B.,Martin,P.L. und Roeder,R.G. (1983). Transcription of class III genes: Formation of preinitiation complexes. *Science* 222, 740-748
- 60 Bieker,J.J.,Martin,P.L. und Roeder,R.G. (1985). Formation of a rate-limiting intermediate in 5S RNA gene transcription. *Cell* 40, 119-127

- 61 Engelke,D.R.,Ng,S.Y.,Shastry,B.S. und Roeder,R.G. (1980). Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes. *Cell* 19, 717-728
- 62 Vincent,A. (1986). TFIIIA and homologous genes. The "finger" proteins. *Nucl. Acids Res.* 14, 4385-4391
- 63 Walter,P. und Blobel,G. (1982). Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature* 299, 691-698
- 64 Weiner,A.M. (1980). An abundant cytoplasmic 7S RNA is complementary to the dominant interspersed middle repetitive DNA sequence family in the human genome. *Cell* 22, 209-218
- 65 Reddy,R.,Henning,D.,Subrahmanyam,C.S. und Busch,H. (1984). Primary and secondary structure of 7-3(K) RNA of Novikoff Hepatoma. *J. Biol. Chem.* 259, 12265-12270
- 66 Sohn,U.,Szysko,J.,Coombs,D. und Krause (1983). 7S-K nuclear RNA from simian virus co-transformed cells has sequence homology to the viral early promoter. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 80, 7090-7094
- 67 Gunning,P.W.,Shooter,E.M.,Austin,L. und Jeffrey,P.L. (1981). Differential and coordinate regulation of the eukaryotic small molecular weight RNAs. *J. Biol. Chem.* 256, 6663-6669
- 68 Zoephel,D. (1986). Isolierung, Charakterisierung und *in-vitro* Transkription von 7S L RNA Gen- und Pseudogensequenzen. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- 69 Krüger,W. (1986). Klonierung und *in-vitro* Transkription eines menschlichen 7S K RNA Gens. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- 70 Ullu,E. und Weiner,A.M. (1984). Human genes and pseudogenes for the 7S L RNA component of signal recognition particle. *EMBO J.* 3, 3303-3310
- 71 Krüger,W. und Benecke,B.J. (1987). Structural and functional analysis of a human 7S K RNA gene. *J. Mol. Biol.* 195, 31-41
- 72 Murphy,S.,Tripodi,M. und Melli,M. (1986). A sequence upstream from the coding region is required for the transcription of the 7S K RNA genes. *Nucl. Acids Res.* 9243-9260
- 73 Murphy,S.,Liegro,C.D. und Melli,M. (1987). The *in vitro* transcription of the 7S K RNA gene by RNA polymerase III is dependent only on the presence of an upstream promoter. *Cell* 51, 81-87
- 74 Gey,G.O.,Coffman,W.D. und Kubiccek,M.T. (1952). Tissue culture studies of the proliferation capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12, 264-265

- 75 Puck, T.T., Marcus, P.J. und Cieciura, S.J. (1956). Clonal growth of mammalian cells *in vitro*: Growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a "feeder" layer. *J. Exp. Med.* 103, 273-284
- 76 Smith, J.D., Freeman, G., Vogt, M. und Dulbecco, R. (1960). The nucleic acid of polyoma virus. *Virology* 12, 185-196
- 77 Joklik, W.K. pers. Mitteilung an Fa. Gibco/BRL
- 78 Earle, W.R. (1943). Production of malignancy *in vitro* IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Nat. Cancer Inst.* 4, 165-212
- 79 Voß, D. (1985) Untersuchung regulatorischer Sequenzen des Dotterproteingens Yp2 von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum
- 80 Graham, F.L. und van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-457
- 81 Spandidos, D.A. und Wilkie, N.M. (1984). Expression of exogenous DNA in mammalian cells. in *Transcription and Translation a practical approach*, 1-48. IRL Press
- 82 Davis, L.G., Dibner, M.D. und Battey, J. (1986). Guanidine isothiocyanate preparation of total RNA. in *Basic Methods in Molecular Biology*, 129-135. Elsevier
- 83 Gorman, C.M., Leslie, F.M. und Howard, B.H. (1982). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2, 1044-1051
- 84 Dahlberg, J.E. und Schenborn, E.T. (1988). The human U1 snRNA promoter and enhancer do not direct synthesis of messenger RNA. *Nucl. Acids Res.* 16, 5827-5840
- 85 Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- 86 Favoloro, J., Treisman, R. und Kamen, R. (1980). Transcription maps of polyoma virus-specific RNA: Analysis by two-dimensional nuclease S1 gel mapping. *Meth. Enzymol.* 65, 718-749
- 87 Berk, A.J. und Sharp, P.A. (1977). Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. *Cell* 12, 721-732
- 88 Penman, S. (1966). RNA metabolism in the HeLa cell nucleus. *J. Mol. Biol.* 17, 117-130
- 89 Melton, D.A. (1984). Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucl. Acids Res.* 12, 7035-7056
- 90 Twigg, A.J. und Sheratt, D. (1980). Trans-complementary copy-number mutants of plasmid ColE1. *Nature* 283, 216-218

- 91 Wahl,G. (1989). Rapid and definitive restriction mapping. *Stratagies* 2, 1-3
- 92 Messing,J. und Viera,J. (1982). A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. *Gene* 19, 269
- 93 Chaconas,G. und van de Sande,J.H. (1980). 5'-³²P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Meth. Enzymol.* 65, 75-85
- 94 Maniatis,T.,Fritsch,E.F. und Sambrook,J. (1982). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Habor Laboratory N.Y.
- 95 Kroecker,W.D. und Kowalski,D. (1982). Gene-sized pieces produced by digestion of linear duplex DNA with Mung Bean nuclease. *Biochemistry* 17, 3236-3243
- 96 Yanish-Perron,C.,Viera,J. und Messing,J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119
- 97 Appleyard,R.K. (1954). Segregation of new lysogenic types during growth of a double lysogenic strain derived from *Escherichia coli*. *Genetics* 39, 440-452
- 98 Birnboim,H.C. und Doly,J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513
- 99 Russel,M.,Kidd,S. und Kelley,M.R. (1986). An improved filamentous helper phage for generating single-stranded plasmid DNA. *Gene* 45, 333-338
- 100 Maxam,A.M. und Gilbert,W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Meth. Enzymol.* 65, 499-560
- 101 Winberg,G. und Hammarskjöld,M.L. (1980). Isolation of DNA from agarose gels using DEAE-paper. Application to restriction site mapping of adenovirus type 16 DNA. *Nucl. Acids Res.* 8, 213-264
- 102 Dretzen,G.M.,Bellard,P.,Sassoni-Corsi,P. und Chambon,P. (1981). A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamid gels. *Anal. Biochem.* 112, 295-298
- 103 Silverman,S.,Schmidt,O.,Söll,D. und Hovemann,B. (1979). The nucleotide sequence of a cloned *Drosophila* arginine tRNA gene and its *in vitro* transcription in *Xenopus* germinal vesicle extracts. *J. Biol. Chem.* 254, 10290-10294
- 104 Sanger,F., Nicklen,S. und Coulson, A.R. (1977). Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467
- 105 Geisler,M. (1987). Analyse regulatorisch wichtiger Sequenzen der 7S RNA-Gene für die RNA-Polymerase III-katalysierte Transkription. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum

- 106 Sollner, Webb, B. und Reeder, R.H. (1979). The nucleotide sequence of the initiation and termination sites for ribosomal RNA transcription in *X. laevis*. *Cell* 18, 485-499
- 107 Kleinert, H. und Benecke, B.J. (1988). Transcription of human 7S K DNA *in vitro* and *in vivo* is exclusively controlled by an upstream promoter. *Nucl. Acids Res.* 16, 1319-1331
- 108 Kleinert, H., Gladen, A., Geisler, M. und Benecke, B.J. (1988). Differential regulation of transcription of human 7S K and 7S L RNA genes. *J. Biol. Chem.* 263, 11511-11515
- 109 Ullu, E., Murphy, S. und Melli, M. (1982). Human 7S L RNA consists of a 140 nucleotide middle-repetitive sequence inserted in an Alu sequence. *Cell* 29, 195-202
- 110 Gladen, A. (1988). Identifizierung regulatorisch wichtiger Sequenzen eines menschlichen 7S L RNA-Gens. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum
- 111 Myers, M.R., Tilly, K. und Maniatis, T. (1986). Fine structure genetic analysis of a β -globin promoter. *Science* 232, 613-618
- 112 Schüle, R., Müller, M., Otsuka-Murakami, H. und Renkawitz, R. (1988). Cooperativity of the glucocorticoid receptor and the CACCC-box binding factor. *Nature* 332, 87-90
- 113 Schüle, R., Müller, M., Kaltschmidt, C. und Renkawitz, R. (1988). Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors. *Science* 242, 1418-1420
- 114 Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. und Roeder, R.G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl. Acids Res.* 11, 1475-1489
- 115 Wildeman, A.G., Sassone-Corsi, P., Grundström, T., Zenke, M. und Chambon, P. (1984). Stimulation of *in-vitro* transcription from SV40 early promoter by the enhancer involves a specific *trans*-acting factor. *EMBO J.* 3, 3129-3133
- 116 Galas, D.J. und Schmitz, A. (1978) DNAase footprinting: A simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucl. Acids Res.* 5, 3157-3170
- 117 Ohlson, H. und Edlund, T. (1986) Sequence-specific interactions of nuclear factors with the insulin gene enhancer. *Cell* 45, 35-44
- 118 Bredow, S. (1986). Untersuchungen zur *in-vitro* Transkription eines menschlichen 7S K-Gens mit isolierter RNA Polymerase III und partiell gereinigten Faktoren. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum
- 119 Simon, M.C., Fisch, T.M., Benecke, B.J., Nevins, J.R. und Heintz, N. (1988). Definition of multiple, functionally distinct TATA elements, one of which is a target in the hsp70 promoter for E1A regulation. *Cell* 52, 723-729

- 120 Sakonju,S.,Bogenhagen,D.F. und Brown,D.D. (1980). A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: I. the 5' border of the region. *Cell* 19, 13-25
- 121 Grosschedl,R. und Birnstiel,M.L. (1980). Identification of regulatory sequences in the prelude sequences of an H2A histone gene by the study of specific deletion mutants *in-vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1432-1436
- 122 Benoist,C. und Chambon,P. (1981). In vivo sequence requirements of the SV40 early promoter region. *Nature* 290, 304-310
- 123 Fletcher,C.,Heintz,N. und Roeder,R.G. (1987). Purification and characterization of OTF-1, a transcription factor regulating cell cycle expression of a human histone H2B gene. *Cell* 51, 773-781
- 124 Danesch,U.,Gloss,B.,Schmid,W.,Schütz,G.,Schüle,R. und Renkawitz,R. (1987). Glucocorticoid induction of the rat tryptophan oxygenase gene is mediated by two widely separated glucocorticoid-responsive elements. *EMBO J.* 6, 625-630
- 125 Howe,J.G. und Shu,M.D. (1989). Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: Unique transcription units that combine RNA polymerase II and III promoter elements. *Cell* 57, 825-834
- 126 Metzger,D.,White,J.H. und Chambon,P. (1988). The human oestrogen receptor functions in yeast. *Nature* 334, 31-35
- 127 Webster,N.,Jin,J.R.,Green,S.,Hollis,M. und Chambon,P. (1988). The yeast UAS_G is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 trans-activator. *Cell* 52, 169-178

Lebenslauf

11.03.1960	geboren in 465 Gelsenkirchen
1966-1969	Besuch der Grundschule an der Diesterwegstraße in 465 Gelsenkirchen-Bismarck
1969-1970	Besuch der Hauptschule an der Laarstraße in 465 Gelsenkirchen-Bismarck
1970-1979	Besuch des Gauß-Gymnasiums in 465 Gelsenkirchen- Bulmke
1979	Erhalt der allgemeinen Hochschulreife
1979	Einschreibung an der Ruhr-Universität Bochum im Fach Chemie (Abschluß Diplom)
1980	Einschreibung an der Ruhr-Universität Bochum im Fach Biologie (Abschluß Diplom)
1980-1986	Biologiestudium an der Ruhr-Universität Bochum
1985-1986	Anfertigung der Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie bei Prof. Dr. B.J. Benecke
13.2.1986	Erlangung des Grades eines Diplombiologen
1986-1989	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Biochemie unter der Leitung von Prof. Dr. B.J. Benecke

Veröffentlichungen:

Kleinert,H. und Benecke,B.J. (1988). Transcription of human 7S K DNA *in vitro* and *in vivo* is exclusively controlled by an upstream promoter. Nucl. Acids Res. 16, 1319-1331

Kleinert,H.,Gladen,A.,Geisler,M. und Benecke,B.J. (1988). Differential regulation of transcription of human 7S K and 7S L RNA genes. J. Biol. Chem. 263, 11511-11515

